

DOCTORADO EN CIENCIAS Y BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

**Metabolitos fitotóxicos en la interacción planta-patógeno:
El caso de *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee. y
Tagetes erecta L.**

**Tesis para obtener el grado de
Doctor en Ciencias presenta**

Q.F.B. Joaquín Alejandro Qui Zapata

Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México

2008

AGRADECIMIENTOS

El trabajo experimental se desarrolló en el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) en las Unidades de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas y Biotecnología, bajo la dirección de la Dra. Miranda Ham y del Dr. Peña Rodríguez.

El trabajo experimental contó con la colaboración de M. en C. Lizbeth Castro Concha y de Q.F.B. Karlina García Sosa.

Esta tesis fue financiada por el CICY y CONACYT (beca # 183263).

El autor desea mostrar su profundo agradecimiento a las siguientes personas:

A la Dra. María de Lourdes Miranda Ham por sus enseñanzas, consejos y disciplina que me permitieron mantener el camino del trabajo de investigación y llegar a buen termino.

Al Dr. Luis Manuel Peña Rodríguez por sus consejos, enseñanzas y amistad.

A M. en C. Lizbeth Castro por su apoyo técnico y su amistad invaluable.

A los integrantes del Laboratorio # 8 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, por el apoyo durante este tiempo.

A los integrantes del Grupo de Química Orgánica de la Unidad de Biotecnología, por su amistad, apoyo y críticas.

DEDICATORIA

A toda mi familia, que siempre me han apoyado incondicionalmente.

A mi Madre Deysi, por su dedicación, apoyo y sobre todo por su amor que me ha permitido transitar por este camino cumpliendo metas.

A mi Padre Joaquín, quien con su ejemplo y apoyo, me ha permitido emprender y terminar todo lo que me he propuesto.

A mi esposa Mayra, por su amistad y apoyo invaluable en este camino.

A mi hija Diana, quien con su sonrisa ilumina mi vida.

CONTENIDO

Agradecimientos	i
Dedicatoria	iii
Contenido	v
Lista de figuras	vii
Lista de cuadros	ix
Resumen	xi
Abstract	xlii
Introducción	1
Bibliografía	3
Capítulo 1. Antecedentes	5
1.1 Interacciones planta-patógeno	5
1.2 Defensa vegetal	8
1.3 Establecimiento de la infección	15
1.4 Fitotoxinas	16
1.5 Mecanismos de acción de metabolitos fitotóxicos	23
1.6 Evaluación del papel de los metabolitos fitotóxicos producidos por hongos en la interacción planta-patógeno	28
1.7 Estudios en la interacción <i>Alternaria tagetica</i> – <i>Tagetes erecta</i>	29
1.8 Hipótesis	31
1.9 Objetivos	31
1.10 Diseño experimental	32
1.11 Bibliografía	33
Capítulo 2. Obtención de las fracciones fitotóxicas de cultivos de <i>Alternaria tagetica</i> Shome & Mustafee	41
2.1 Introducción	41
2.2 Materiales y Métodos	42
2.3 Resultados	45
2.4 Conclusiones	49
2.5 Bibliografía	50
Capítulo 3. Establecimiento y caracterización de los cultivos celulares de <i>Tagetes erecta</i> L.	51
3.1 Introducción	51
3.2 Materiales y Métodos	52
3.3 Resultados	54
3.4 Discusión	59
3.5 Bibliografía	60
Capítulo 4. Establecimiento de las condiciones de evaluación	63
4.1 Introducción	63

4.2 Materiales y Métodos.....	64
4.3 Resultados.....	65
4.4 Discusión.....	71
4.5 Bibliografía.....	72
Capítulo 5. Differential effects of phytotoxic metabolites from <i>Alternaria tagetica</i> on <i>Tagetes erecta</i> cell cultures	73
5.1 Abstract.....	73
5.2 Introduction.....	74
5.3 Materials and Methods.....	76
5.4 Results.....	79
5.5 Discussion.....	86
5.6 References.....	89
Capítulo 6. Evaluación del zinniol en los mecanismos de patogénesis y defensa vegetal en cultivos celulares de <i>T. erecta</i>.	93
6.1 Introducción.....	93
6.2 Materiales y Métodos.....	94
6.3 Resultados.....	96
6.4 Discusión.....	103
6.5 Bibliografía.....	105
Capítulo 7. Discusión general	109
Bibliografía.....	114
Capítulo 8. Perspectivas	119
Anexos	121
9.1 <i>Alternaria tagetica</i> Shome & Mustafee.....	121
9.2 <i>Tagetes erecta</i> L.....	122
9.3 Bibliografía.....	124

Lista de Figuras

Figura	Pag.
1.1 Modelo molecular del reconocimiento gen-a-gen.	11
1.2 Ejemplos de fitotoxinas hospedero selectivas (HST).	19
1.3 Ejemplos de fitotoxinas hospedero no selectivas (no-HST).	21
1.4 Interacción entre un hongo fitopatógeno productor de fitotoxinas y la célula vegetal hospedera.	25
1.5 Metabolitos aislados de la fracción lipofílica de cultivos de <i>A. tagetica</i> .	30
2.1 Esquema de obtención de las fracciones fitotóxicas.	43
2.2 Esquema de reacción de la reducción de ftálidos de zinniol a zinniol.	44
2.3 Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas del cultivo de <i>A. tagetica</i> a bajas concentraciones en hojas de <i>T. erecta</i> .	47
2.4 Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas del cultivo de <i>A. tagetica</i> a altas concentraciones en hojas de <i>T. erecta</i> .	48
3.1 Cultivos <i>in vitro</i> de <i>T. erecta</i> .	55
3.2 Primera caracterización de los cultivos celulares de <i>T. erecta</i> .	57
3.3 Segunda caracterización de los cultivos celulares de <i>T. erecta</i> .	58
4.1 Determinación de la concentración umbral de la Fracción A.	65
4.2 Actividad fitotóxica de la Fracción A.	66
4.3 Viabilidad celular de cultivos de <i>T. erecta</i> de diferentes edades.	67
4.4 Determinación de la concentración umbral de la Fracción B.	68
4.5 Determinación de la concentración umbral de la Fracción C.	69
4.6 Determinación de la concentración umbral de la Fracción D.	70
5.1 Phytotoxic activity, expressed as changes in viability, fresh weight and number of cells, of fractions A, B and C on <i>T. erecta</i> cell cultures after	80

48 hours.

5.2	Effect of phytotoxic fractions A, B and C on cell morphology (20x).	81
5.3	Production of H ₂ O ₂ in <i>T. erecta</i> suspension cultures exposed to the phytotoxic fractions A, B and C.	83
5.4	Nuclear DNA damage in <i>T. erecta</i> suspension cultures exposed to the different <i>A. tagetica</i> phytotoxic fractions.	84
5.5	Genomic DNA fragmentation patterns in cells from <i>T. erecta</i> suspension cultures exposed to the different phytotoxic fractions A, B and C.	85
6.1	Disminución de la viabilidad celular de los cultivos celulares de <i>T. erecta</i> .	97
6.2	Disminución del peso fresco de los cultivos celulares de <i>T. erecta</i> .	98
6.3	Daño en la membrana celular provocado por las diferentes fracciones fitotóxicas de <i>A. tagetica</i> en cultivos celulares de <i>T. erecta</i> .	99
6.4	Efectos de las diferentes fracciones de <i>A. tagetica</i> sobre la morfología celular en cultivos de <i>T. erecta</i> .	100
6.5	Efecto de las diferentes fracciones fitotóxicas de <i>A. tagetica</i> sobre el ADN nuclear en cultivos de <i>T. erecta</i> .	101
6.6	Efecto de las diferentes fracciones fitotóxicas de <i>A. tagetica</i> sobre la integridad del ADN genómico en cultivos de <i>T. erecta</i> .	102
9.1	<i>Alternaria tagetica</i> Shome & Mustafee.	121
9.2	<i>Tagetes erecta</i> L.	123

Cuadro	Lista de Cuadros	Pag.
1.1.	Clasificación de patógenos de acuerdo a la obtención de nutrientes a partir de su hospedero	6
2.1.	Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas de cultivo de <i>A. tagetica</i> en hojas de <i>T. erecta</i> .	46
5.1.	Effect of phytotoxic fractions A, B and C on the integrity of cell membranes of <i>T. erecta</i> cultures after 48 hours of treatment	82

Resumen

Alternaria tagetica es un hongo fitopatógeno, agente causal de la enfermedad del "tizón" en cempazúchitl. Este patógeno sintetiza una amplia gama de metabolitos que presentan estructuras químicas de variada complejidad, los cuales muestran actividad fitotóxica cuando son evaluados en hojas de *Tagetes erecta*. Uno de estos metabolitos, el zinniol, ha sido clasificado como una toxina hospedero no-selectiva, y está relacionado con la virulencia del patógeno que lo produce, además de ser el principal responsable de la actividad fitotóxica en hojas.

El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos, a nivel celular, de los diferentes grupos de metabolitos producidos por *A. tagetica*, cuando ellos interaccionan con su planta hospedera, así como determinar si se presenta una respuesta diferencial en la inducción de mecanismos de defensa claves, como son el daño a la membrana celular, la producción de especies reactivas de oxígeno y la fragmentación del DNA nuclear.

Los resultados mostraron que las diferentes fracciones fitotóxicas tuvieron efectos adversos en los cultivos celulares de *T. erecta*, y estos efectos están relacionados a algunos mecanismos de patogénesis atribuidos a las fitotoxinas. La exposición de las células al total de los metabolitos producidos por *A. tagetica* en el medio de cultivo disparó una muerte celular programada. Sin embargo, cuando estos metabolitos fueron separados de acuerdo a su naturaleza química (hidrofílica o lipofílica), la muerte celular inducida en respuesta a la interacción se relacionó principalmente con un proceso tóxico.

Es de notarse que el zinniol puro no induce un efecto fitotóxico marcado sobre las células a una concentración en la cual se induce necrosis en hojas. Los efectos sobre la membrana celular y la fragmentación del DNA son menos intensos, que los inducidos durante la exposición a las otras fracciones fitotóxicas de *A. tagetica*. El zinniol ha sido reportado como un metabolito con la actividad fitotóxica más alta en hojas durante la interacción *T. erecta*-*A. tagetica*. Con base en los resultados obtenidos en este trabajo, se puede observar que el zinniol no es el único responsable de la actividad fitotóxica entre los metabolitos producidos por *A. tagetica* a nivel celular, y por lo tanto, no cumple con los requisitos atribuidos a una fitotoxina clásica. Este estudio presenta una nueva perspectiva en la búsqueda del papel de las fitotoxinas, y los metabolitos producidos por hongos fitopatógenos en general, durante la interacción planta-patógeno.

Abstract

Alternaria tagetica is a phytopathogenic fungus that causes early blight in marigold. This pathogen synthesizes a broad range of metabolites having chemical structures of varying complexity that have shown phytotoxic activity when tested in leaves of *Tagetes erecta*. One of these phytotoxic metabolites, zinniol, has been reported as a non-host selective toxin, and is related to the virulence process of the pathogen producing it, and described as the major responsible of phytotoxic activity in leaves.

The objective of this study was to evaluate the effects, at the cellular level, of the different groups of metabolites produced by *A. tagetica*, when they interact with its host plant, and to determine if there was a differential response in the induction of key defense mechanisms, such as damage to the cell membrane, ROS production and nuclear DNA fragmentation. The results showed that the different phytotoxic fractions have adverse effects on *T. erecta* cell suspension cultures, and that these effects are related to some pathogenesis mechanisms attributed to phytotoxins. Exposure of cells to the total metabolites released by *A. tagetica* into the culture media triggered a programmed cell death process. However, when these metabolites were separated according to their chemical nature, i.e. hydrophilic or lipophilic compounds, the induced death response could be related to a toxic shock.

Nevertheless, pure zinniol did not produce a marked phytotoxic effect on cells at a concentration, which had induced necrosis in the plant's leaves. Moreover its effects on cell membranes and DNA fragmentation are less intense than those caused by the exposure to other fractions from an *A. tagetica* culture. Zinniol has always been reported as the metabolite with the highest phytotoxic activity in leaves during the *T. erecta*-*A. tagetica* interaction.

Based on our results, it appears that zinniol is not the sole responsible of the phytotoxic activity of the lipophilic metabolites produced by *A. tagetica* at the cellular level and thus, do not present the characteristics attributed to a classic phytotoxin. This study presents a new perspective in the search for the role of phytotoxins, and for metabolites produced by phytopathogenic fungi in general, during the plant-pathogen interaction.

INTRODUCCIÓN

Las interacciones entre microorganismos y plantas, detonantes en muchas ocasiones de plagas y hambrunas, han sido de gran importancia en el desarrollo de la civilización. Un ejemplo del impacto de estas interacciones está dado por la hambruna ocurrida en Irlanda como resultado de la pérdida de los cultivos de papa, inducida por *Phytophthora infestans* en cultivares susceptibles de este tubérculo (Knogge, 1996). El estudio de las interacciones planta-microorganismo puede ser fundamental para mejorar la producción agrícola al proveer novedosas herramientas, e.g. el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, para la transferencia de información genética a una especie vegetal en particular (Jackson & Taylor, 1996).

Los hongos constituyen un grupo versátil de organismos eucariontes carbono-heterotróficos, que ocupan diversos hábitats y presentan diferentes morfologías de esporas e hifas. Muchas especies de hongos causan enfermedades importantes en plantas. Los hongos fitopatógenos van desde parásitos facultativos hasta parásitos obligados (Hahn et al., 1989).

El primer paso en el proceso de infección incluye la eliminación de las barreras de protección de la planta, a través de mecanismos diferentes que permiten desarrollar una "compatibilidad" con el hospedero. Después de la penetración, el siguiente paso utilizado por el hongo para colonizar una especie vegetal es la secreción de toxinas que dañan el tejido vegetal o que mimetizan la actividad de algún fitoregulator, lo que permite al microorganismo manipular la fisiología de la célula en su beneficio (Knoche & Duvick, 1987; Knogge, 1996).

El interés por estudiar las fitotoxinas y evaluar su papel en el desarrollo de las enfermedades en plantas, surgió en la década de los 70's a raíz de las destrucciones masivas en Estados Unidos de cultivos de maíz y avena infectados por *Helminthosporium maydis* y *H. victoriae*, respectivamente, y en Japón en las enfermedades en manzano y pera causadas por *Alternaria alternata* f.sp. *mali* y *A. alternata* f.sp. *kikuchiana* en Japón. En cada caso, los efectos destructivos de los patógenos se atribuyeron a la acción de sus fitotoxinas, demostrándose la existencia de una relación directa entre la producción de éstas y su capacidad para infectar la planta (Otani et al., 1995; Panigrahi, 1997). Estas epidemias proporcionaron la justificación económica necesaria para que se iniciaran los primeros trabajos sobre fitotoxinas. Desde entonces, el interés despertado en las diferentes ramas de las ciencias vegetales es amplio; los fitopatólogos se han interesado en conocer las bases moleculares de la resistencia y la susceptibilidad en plantas, los químicos se han enfocado a la purificación, identificación y síntesis de las fitotoxinas, por su parte los biólogos y los agrónomos han reconocido este tipo de metabolitos como herramientas útiles en los estudios de los mecanismos de acción y en las prácticas de fitomejoramiento de especies económicamente importantes (Agrios, 1978; Strobel et al., 1991).

Aún cuando se conoce un buen número de patógenos productores de fitotoxinas, el conocimiento actual de estos metabolitos se debe principalmente a los llamados patógenos necrotróficos pertenecientes a los géneros *Alternaria*, *Botrytis* y *Cochliobolus*. Se ha determinado que algunas fitotoxinas actúan a nivel de membrana celular, dañando el ADN, elevando los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) o desencadenando la muerte celular programada. Sin embargo, la mayor parte de los estudios con fitotoxinas tienen como objetivo elucidar los mecanismos de acción de estos metabolitos, sin considerar la amplia gama de metabolitos producidos por el patógeno, durante su interacción con el hospedero y sin establecer el verdadero papel de la fitotoxina en la interacción planta-patógeno (Knogge, 1996; Wang, et al., 1996).

El hongo *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee se ha identificado como el patógeno responsable del marchitamiento del tallo, las hojas y las flores de *Tagetes erecta* L (xpuhuk, flor de muerto o cempasúchil), un importante cultivo en México y en Estados Unidos para la producción de colorantes. En México, se han descrito pérdidas de hasta 100% en la producción de flores como resultado de la infección por *A. tagetica* (Trostle, 1968; García et al., 1992); recientemente se reportó la presencia de este patógeno en cultivos de *T. erecta* en Japón (Tomioka et al., 2000).

El hongo *A. tagetica* produce metabolitos de naturalezas hidrofílica y lipofílica que presentan actividad fitotóxica en el ensayo de gota en hojas de *T. erecta* (Cotty et al., 1983; Gamboa-Angulo et al., 2002). Tomando como base estos estudios, en este proyecto se planteó evaluar las respuestas que se presentan a nivel celular, cuando los metabolitos producidos por un fitopatógeno, como *A. tagetica*, afectan a su planta hospedera, *T. erecta*; entre las respuestas evaluadas se incluyen: daño a la membrana celular, formación de ROS y daño a nivel del ADN nuclear. Los resultados obtenidos permitieron establecer que los diferentes metabolitos fitotóxicos producidos por el patógeno inducen una respuesta diferencial o específica en la planta, dependiendo de su naturaleza química.

BIBLIOGRAFÍA

Agrios, G. (1978). *Plant Pathology*. Academic Press, New York.

Cotty, P., J. Misaghi and R. Hine (1983). *Production of zinniol by Alternaria tagetica and its phytotoxic effect on Tagetes erecta*. *Phytopathology*, 73, 1326-1328.

Gamboa-Angulo, M. Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2002). *Natural zinniol derivatives from Alternaria tagetica. Isolation, synthesis, and structure-activity correlation*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1053-1058.

García, A. Oviedo, A. R. Ramírez and A. Vázquez (1992). *Cultivo de la flor de cempazúchitl*. Laboratorios Bioquímex S.A de C.V., Oaxaca.

Hahn, M., Bucheli, P., Ceivoni, F., Donies, S., O'Neill, R., A. Darvill and P. Albersheim (1989). "Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interaction", in: *Plant-Microbe Interaction. Molecular and Genetic Perspectives*. Kosuge, T. and Nester, E. (eds.) McGraw-Hill Publishing Company, New York, pp 131-181.

Jackson, A. and C. Taylor (1996). *Plant-microbe interactions: Life and death at the interface*. *The Plant Cell*, 8, 1651-1668.

Knoche, H. and J. Duvick (1987). "The role of fungal toxins in plant disease", in: *Fungal Infection of Plants. Symposium of the British Mycological Society*. Pegg G. and Ayres, P. (eds.). Cambridge University Press, Cambridge, pp 158-192.

Knogge, W. (1996). *Fungal infection of plants*. *The Plant Cell*, 8, 1711-1722.

Otani, H., M. Kodama and K. Kohomoto (1995). "Physiological and molecular aspects of *Alternaria* host-specific toxin and plant interactions", in: *Molecular Aspects of Pathological Resistance: Require Signal Transduction*. Mills, D. (ed.). APS Press, Minnesota, pp 257-267.

Panigrahi, S. (1997). "*Alternaria* toxins", in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Felix, J.P. (ed.). CRS Press, Boca Ratón, pp 319-336.

Strobel, G., Kenfield, D., Bunkers, G., F. Sugawara and J. Clardy (1991). *Phytotoxins as potential herbicides*. *Experientia*, 47, 819-827.

Tomioka, K., Sato, T. and Koganezama, H. 2000. *Marigold leaf spot caused by Alternaria tagetica new to Japan*. *Journal of General Plant Pathology*, 66, 294-298.

Trostle, N. 1968. *The ethnobotany of Tagetes*. *Economic Botany*, 45, 317-325.

Wang, H., Li, J., R. Bostock and D. Gilchrist (1996). *Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development*. The Plant Cell, 8, 375-391.

Capítulo 1

Antecedentes

1.1 INTERACCIONES PLANTA-PATÓGENO

Bajo condiciones naturales, las plantas interactúan con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido a la manifestación de diferentes mecanismos de defensa. Se ha postulado que la resistencia en plantas y la avirulencia en organismos patogénicos son la regla, mientras que la susceptibilidad y la virulencia son la excepción, siendo la resistencia y la susceptibilidad los extremos de un continuo (Jackson & Taylor, 1996). Los productos de los genes que determinan la resistencia específica o la susceptibilidad en la planta son complementarios a los productos de los genes que determinan la virulencia o la avirulencia en el patógeno (Deverall, 1977; Manners, 1993).

Las interacciones entre una planta y un microorganismo pueden ser de varios tipos y van desde las relaciones altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas en que ambos se benefician. Como consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollaron de forma patogénica sólo en un rango limitado de hospedantes, frecuentemente a nivel de género, de especie o de subespecie. De forma similar, las especies y cultivares de plantas, por lo general, son susceptibles solamente a unas cuantas especies, patovares o razas de patógenos (Prell & Day, 2001; Heath, 2000).

Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrimentos de fuentes existentes, para esto necesitan invadir y adaptarse al tejido del hospedante, además de evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta y eventualmente reproducirse (Cuadro 1.1). Aquellos patógenos capaces de desarrollarse y reproducirse sólo en tejidos vivos son llamados biotróficos. Estos patógenos, también conocidos como parásitos obligados, mantienen viva a la célula hospedante y emplean para ello, mecanismos de invasión sumamente sutiles que resultan en una interacción muy cercana con ésta (Manners, 1993). Otro tipo de patógenos, denominados necrotróficos, producen la muerte de las células hospedantes obteniendo de esta forma los nutrimentos a partir del tejido muerto. Este último grupo de microorganismos con frecuencia utiliza toxinas o enzimas capaces de degradar el tejido de la planta, para facilitar la invasión y colonización (Hutchenson, 1999; van Kan, 2006). Existe otro grupo que ha sido denominado hemibiotróficos, con características de los dos grupos anteriores; los patógenos de este grupo presentan una etapa inicial biotrófica, en la cual establecen una estrecha relación con el hospedante y obtienen sus nutrientes del tejido vivo y, una fase necrotrófica posterior,

que se relaciona con la liberación de las esporas, para continuar el ciclo de vida del patógeno (Manners, 1993; Buchanan et al., 2000).

Cuadro 1.1. Clasificación de patógenos de acuerdo a la obtención de nutrientes a partir de su hospedero (Buchanan et al., 2000).

	Biotróficos	Hemibiotróficos	Necrotróficos
Estrategia de ataque	Contacto intracelular íntimo con las células vegetales	Fase biotrófica inicial, fase necrotrófica tardía	Secreción de enzimas degradadoras de pared celular. Secreción de fitotoxinas
Características específicas de la interacción	Las células vegetales permanecen vivas en el transcurso de la infección. Daño mínimo a la célula vegetal	Las células vegetales sobreviven solamente en los estadios iniciales de la infección. Daño extenso en el tejido vegetal en estadios tardíos	Muerte de tejido vegetal para entonces ser colonizado por el patógeno. Maceración extensiva de tejido
Rango de hospederos	Reducido; a menudo solamente una especie de planta es atacada	Intermedio	Amplio
Ejemplos	"Cenicillas" y "royas" fúngicas, virus y nematodos ecto y endoparásitos; bacterias, <i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Phytophthora infestans</i> , (agente causal del tizón tardío de la papa), <i>Mycosphaella fijiensis</i> (Sigatoka negra)	Podredumbre bacteriana, <i>Erwinia</i> spp.; podredumbre fúngica, <i>Botrytis cinerea</i> ; tizones, <i>Alternaria</i> spp.

La especificidad en las interacciones planta-patógeno depende tanto de los genotipos de la planta como del patógeno. Esta especificidad es más fácil de estudiar a nivel de cultivar, es decir, en especies cultivadas que han sido sometidas a un proceso de mejoramiento para producir poblaciones de plantas altamente homogéneas en su contenido genético. Como resultado de este proceso, nuevas razas de patógenos específicas para cada cultivar, aparecen debido a la presión de selección. En el caso de una interacción biotrófica se tiene un alto grado de especificidad, ya que el patógeno necesita mantener a las células hospedantes vivas, evitando la inducción de los mecanismos de defensa para poder sobrevivir. En general, estas relaciones están determinadas a nivel de razas del patógeno y de cultivares del hospedante. La especificidad observada sirve para seleccionar la interacción que proporcione una ventaja para una de las partes o para ambos organismos (Jackson & Taylor, 1996; Knogge, 1996; Huang, 2001).

El grado de patogenicidad se define frecuentemente como virulencia; de esta forma, y dependiendo de su habilidad para provocar enfermedad, un patógeno puede ser altamente virulento para un hospedante y levemente virulento para otro. En otras palabras, la virulencia es un concepto estrechamente ligado a la habilidad del patógeno para superar la resistencia de la planta. Sin embargo, en términos genéticos, el término virulencia se utiliza para definir si una variante o raza de un patógeno puede o no causar enfermedad en una variedad o cultivar del hospedante. Esto es, una raza de un patógeno es virulenta si produce enfermedad, o avirulenta si no la produce a un cultivar determinado del hospedante (Manners, 1993; Huang, 2001).

En las interacciones planta-patógeno a nivel de especie, la resistencia del hospedante se conoce como resistencia no-hospedante, mientras que a nivel de raza-cultivar se denomina resistencia determinada por la raza o específica. En este último caso, una especie de hospedante puede presentar cultivares que muestran resistencia y otros que muestran susceptibilidad a un patógeno dado, el cual a su vez puede presentar razas, tanto virulentas como avirulentas, para un cultivar determinado (Agrios, 1978; Vidhyasekaran, 1988).

Por lo tanto, para estudiar y comprender una interacción planta-patógeno específica es necesario tomar en cuenta los dos componentes del sistema: la virulencia o avirulencia de un patógeno, en relación con la resistencia o susceptibilidad del hospedante. Para otorgar la importancia a la interrelación entre los dos organismos es conveniente utilizar los términos interacción compatible e interacción incompatible. Una relación compatible se refiere a una interacción entre una raza virulenta y un cultivar susceptible, mientras que una relación incompatible se establece cuando el hospedante es resistente y el patógeno es avirulento. Las interacciones incompatibles (hospedante resistente, patógeno avirulento) se caracterizan por estar mediadas por sistemas de reconocimiento que activan la expresión de los mecanismos de defensa específicos. Por el contrario, en las interacciones compatibles (hospedante susceptible, patógeno virulento), el

reconocimiento no se lleva a cabo, la respuesta de defensa no se activa y la enfermedad se establece (Keen, 1990; Jackson & Taylor, 1996; Prell & Day, 2001).

Por lo tanto, el conocimiento de los mecanismos que utilizan las plantas para defenderse del ataque de los patógenos, así como las herramientas que emplean estos organismos para establecer la infección, son de suma importancia para entender la interacción planta-patógeno (Huang, 2001; Prell & Day, 2001).

1.2 DEFENSA VEGETAL

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa, cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. Estos mecanismos de defensa se pueden clasificar en defensa vegetal pasiva y activa (Manners, 1993; Buchanan et al., 2000; Huang, 2001).

1.2.1 Defensa vegetal pasiva

Las plantas pueden poseer mecanismos constitutivos de defensa que proveen, de forma pasiva, resistencia contra los patógenos. Los mecanismos de resistencia constitutiva o "preformada" se pueden dividir en barreras físicas, e. g. cutícula gruesa, tricomas y la presencia de ceras, entre otros; y barreras químicas, tales como la acumulación de productos tóxicos en las células vegetales (Hutchenson, 1999; Huang, 2001)

Las barreras físicas involucran, en gran parte, las características de la superficie de la planta, como la cutícula, los estomas y la pared celular. Los patógenos producen una amplia gama de enzimas que degradan la cutícula y que a menudo son cruciales para la penetración exitosa. El grosor de la cutícula, la presencia de la pared celular secundaria y el tamaño de poros estomáticos pueden afectar el éxito con el cual un patógeno invade un hospedero. Algunas plantas presentan pared celular y/o cutículas muy gruesas y la corteza (cuando se encuentra presente) puede proporcionar un impedimento físico a la infección. La orientación vertical de las hojas se puede agregar a la resistencia de la planta, previniendo la formación de las películas de humedad en las superficies de las hojas, inhibiendo la infección por patógenos que requieren del agua para su motilidad (Huang, 2001).

Las barreras químicas pasivas incluyen metabolitos, como las llamadas "fitoanticipinas", que afectan directamente a los patógenos o a sus vectores. Entre estos últimos, se encuentran fenoles, quinonas, lactonas, glucósidos cianogénicos, saponinas, terpenoides, estilbenos y taninos. Los metabolitos inhibitorios pueden excretarse, acumularse en células muertas o confinarse en la vacuola de forma inactiva. En los estados tempranos de las frutas de numerosas plantas se encuentran metabolitos con actividad antifúngica o antimicrobiana que se degradan gradualmente durante el proceso de maduración, haciendo a la fruta inmadura menos susceptible a enfermedades causadas por fitopatógenos. De esta forma, los mecanismos constitutivos de resistencia en las plantas se basan en los rasgos distintivos de una especie o cultivar particular, y generalmente no involucran una respuesta activa del hospedante ante la presencia del patógeno (Agrios, 1978; Huang, 2001).

1.2.2 Defensa vegetal activa

A diferencia de la defensa pasiva o constitutiva, los mecanismos inducidos de defensa, también llamados de resistencia inducida, se activan solamente como una

respuesta al ataque de un patógeno. La resistencia inducida es un mecanismo activo que involucra cambios claros en el metabolismo de la planta provocados por la expresión diferencial de genes. Por lo tanto, para que ocurra esta inducción es necesaria la mediación de sistemas de reconocimiento específico, mediante los cuales la planta reconoce la presencia del patógeno (Hutchenson, 1999; Prell & Day, 2001).

1.2.2.1 Reconocimiento del patógeno

Ciertos productos como carbohidratos, proteínas y pequeñas moléculas, son capaces de actuar como inductores de defensa. Los inductores no-específicos comprenden cualquier sustancia que induce la activación de defensa de forma no específica, e. g., los polisacáridos que conforman la pared celular, tanto de hongos como de las células vegetales, son reconocidos como agentes capaces de inducir la expresión de genes de defensa en las plantas. Esto es congruente con el hecho de que la muerte del tejido hospedante, causada por el ataque del patógeno o por una reacción de hipersensibilidad, libera componentes de la pared celular vegetal que inducen la activación de defensas en tejidos adyacentes. Asimismo, la actividad de algunas enzimas hidrolíticas producidas por la célula vegetal como reacción de defensa, libera componentes de la pared celular de ciertos hongos que tienen un efecto inductor en los tejidos vegetales (Baker et al., 1997).

Esta respuesta de defensa no específica también se puede activar por factores abióticos como el choque térmico, la sequía, la acción de diferentes productos químicos y la luz ultravioleta. En general, este tipo de inductores abióticos activan las respuestas de defensa al provocar heridas y daño físico en los tejidos (Parker, 2000).

La inducción de la reacción de defensa específica ha sido observada en las interacciones de tipo raza-cultivar, donde el proceso de reconocimiento del patógeno por parte de la planta está determinado por genes presentes tanto en el patógeno como en la planta. En la hipótesis del reconocimiento gen a gen (Fig. 1.1), se propone la existencia de genes en la planta que confieren resistencia a una raza particular de un patógeno y la presencia o ausencia de genes en el patógeno que le confieren la habilidad de causar o no enfermedad en un cultivar determinado. Esta hipótesis propone que los inductores específicos son proteínas codificadas por genes de avirulencia (*Avr*) presentes en el patógeno, capaces de inducir las respuestas de defensa en cultivares que posean los correspondientes genes de resistencia (*R*). De esta forma, el reconocimiento ocurre cuando existe una interacción entre las proteínas codificadas por los genes *R* de la planta y los correspondientes productos de los genes *Avr* del patógeno (Knogge, 1996).

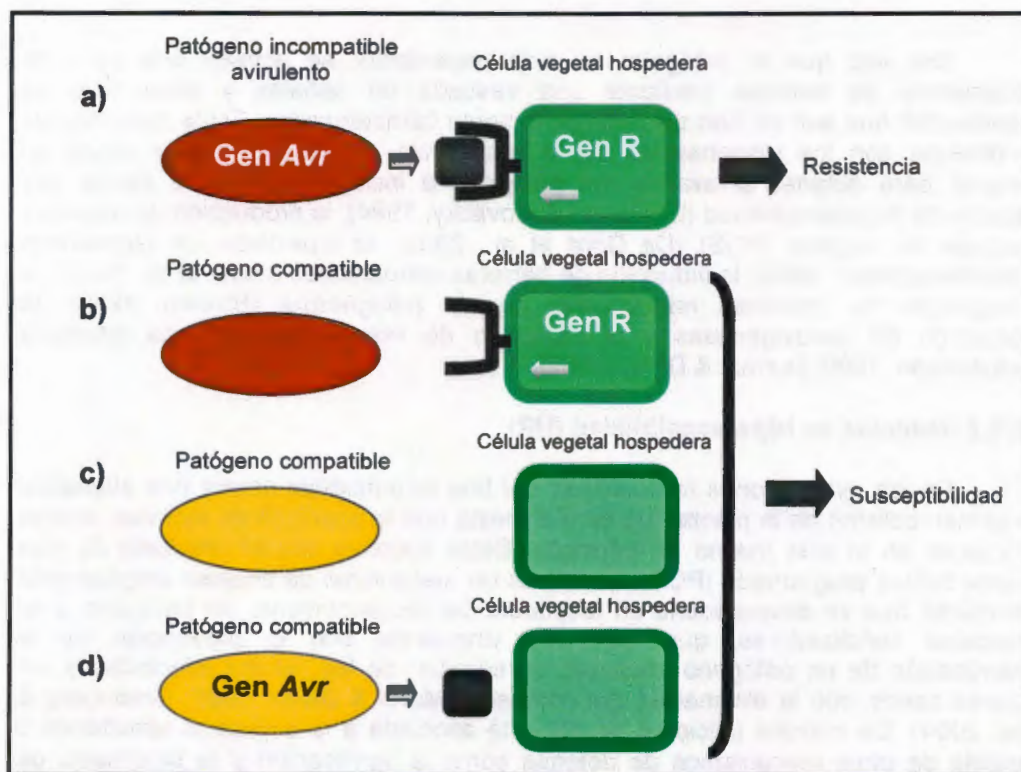


Figura 1.1. Modelo molecular del reconocimiento gen-a-gen. La resistencia ocurre solamente si hay un reconocimiento específico entre el producto del gen R y el producto del gen Avr (a). En ausencia de reconocimiento (b, c y d), no ocurre la reacción de resistencia y el patógeno puede colonizar la planta (Keen et al., 1990).

Una vez que el patógeno ha sido reconocido, se activan una serie de mecanismos de defensa mediante una cascada de señales y otras vías de transducción que aún no han sido completamente caracterizadas. Estos mecanismos de defensa son los responsables de la resistencia, actuando muchas veces en conjunto para detener el avance del patógeno e incluyen la muerte celular por reacción de hipersensibilidad (Goodman & Novacky, 1994), la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (De Gara et al., 2003), la biosíntesis de fitoalexinas (Hammerschmidt, 1999), la inducción de barreras estructurales (Hahn et al., 1989), la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis (Bowles, 1990), la producción de lipooxigenasas y la inducción de resistencia sistémica adquirida (Hutchenson, 1999; Durrant & Dong, 2004).

1.2.2.2 Reacción de Hipersensibilidad (HR)

En las interacciones raza-cultivar del tipo incompatible ocurre una alteración en el metabolismo de la planta que se manifiesta con la aparición de lesiones locales necróticas en el sitio mismo de infección. Estas lesiones son el resultado de una muerte celular programada (PCD). La HR es un mecanismo de defensa ampliamente distribuido, que se desencadena en respuesta del reconocimiento del patógeno o de moléculas señalizadoras, que han sido vinculadas con la prevención de la diseminación de un patógeno mediante el "suicidio" de las células infectadas y, en algunos casos, con la eliminación del patógeno (Morel & Dangl, 1997; Greenberg & Yao, 2004). De manera adicional, la HR está asociada a la expresión simultánea o paralela de otros mecanismos de defensa como la lignificación y la biosíntesis de metabolitos antimicrobianos. Por lo anterior, se le considera responsable directa de la resistencia, al privar de nutrientes al patógeno o al acumular productos dañinos que matan de manera simultánea al patógeno y a las células hospederas (Goodman & Novacky, 1994; Wang et al., 1996).

La HR parece ocurrir como un programa de suicidio activo y organizado, y no como consecuencia del colapso celular pasivo producido por el ataque de un patógeno o por toxinas derivadas de éste (Birch et al., 2000). Lo anterior da como resultado una necrosis controlada, de una manera similar a la apoptosis o la PCD en los tejidos animales. La inducción de la PCD está relacionada, mediante una transducción de señales, con la activación y coordinación de los otros mecanismos mediados por una explosión oxidativa ("oxidative burst") (Dangl et al., 1996; Wojtaszek, 1997; Gilchrist, 1998).

1.2.2.3 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Una característica de la HR es la rápida e intensa producción de ROS. Este término se usa para describir los productos de la reducción secuencial del oxígeno molecular: radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical oxhidrilo ($\cdot\text{OH}$). Las ROS poseen actividad citotóxica, mutagénica, pueden modificar y/o dañar biomoléculas críticas, incluyendo al ADN, los lípidos y las proteínas. La cinética y

funciones de defensa de la generación de ROS en plantas, principalmente $\cdot\text{O}_2^-$ y H_2O_2 , se asemejan a la explosión oxidativa durante la activación de los neutrófilos de mamíferos (Sagi & Fluhr, 2001; Pellinen et al., 2002).

La producción de ROS durante la explosión oxidativa puede servir no sólo como protección contra patógenos invasores, sino como un activador de cascadas de transducción de señales para posteriores reacciones de defensa de la planta, incluyendo la HR de las células infectadas (Grant & Loake, 2000, Overmyer et al., 2003). Adicionalmente, cuando se induce un incremento en la producción de H_2O_2 , en la pared celular se produce un reforzamiento al entrecruzarse las proteínas estructurales mediante la actividad de una peroxidasa, lo que coadyuva a evitar la diseminación del patógeno (De Gara et al., 2003). Después de la explosión oxidativa, hay una importante producción de etileno y de desintegración de la membrana, con la consecuente fuga de electrolitos. Como resultado de estos eventos se producen la muerte celular y la necrosis del tejido.

Aunque la fuente de ROS en plantas ha sido objeto de controversia, evidencias experimentales sugieren que existen enzimas similares a la NADPH oxidasa de neutrófilos (Simon-Plas et al., 2002). Asimismo, se han identificado genes que codifican homólogos de la subunidad gp 91^{phox} de la NADPH oxidasa de neutrófilos en *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* (Sagi & Fluhr, 2001).

1.2.2.4 Fitoalexinas

Las fitoalexinas son metabolitos de baja masa molecular producidos por algunas plantas como respuesta a la infección. Estos metabolitos inhiben el crecimiento de hongos y bacterias *in vivo* e *in vitro*, y su producción durante una infección puede inducir resistencia a subsecuentes ataques por ese patógeno. Estos productos metabólicos normalmente no se encuentran en las plantas sanas, pero su síntesis se desencadena después del ataque. Las fitoalexinas se acumulan en grandes cantidades, tanto en el sitio de penetración, como en las células y tejidos adyacentes a las células que presentan la HR. Entre las fitoalexinas más estudiadas se encuentran aquellas derivadas del metabolismo de los fenilpropanoides que tienen como base al aminoácido fenilalanina. Se conocen aproximadamente 350 fitoalexinas en cerca de 100 especies de plantas y éstas incluyen pterocarpanos, sesquiterpenos, criptofenoles, isocumarinas e isoflavonoides, entre otros. En general, las especies de plantas relacionadas filogenéticamente producen fitoalexinas con estructuras similares y, a menudo, producen más de un tipo, lo que les permite disponer de un coctel tóxico para los patógenos invasores (Hammerschmidt, 1999).

La producción de fitoalexinas se ha asociado con la resistencia a patógenos y con la inducción de una serie de genes que codifican las enzimas específicas responsables de su propia síntesis. Entre estas enzimas, están la fenilalanina amonioliasa, la chalcona sintasa y la chalcona isomerasa (Vidhyasekaran, 1988).

1.2.2.5 Barreras estructurales

Uno de los mecanismos de defensa más inmediatos es la producción y la deposición de sustancias que actúan como barreras físicas, evitando el avance de patógenos. La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies, pero también puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos cuando están sujetos a daño físico. La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica. La síntesis de lignina, al igual que la síntesis de ciertas fitoalexinas, se deriva del metabolismo de los fenilpropanoides. Sin embargo, la síntesis *de novo* de ciertas enzimas, como la cinamoil alcohol deshidrogenasa y algunas peroxidasas, ocurre durante la activación de la defensa contra los patógenos (Huang, 2001).

Además del proceso de lignificación, las plantas producen y depositan otros componentes que previenen el avance de ciertos patógenos, entre estos se puede mencionar a las proteínas ricas en hidroxiprolina y la formación de papilas; estas últimas son estructuras compuestas de calosa (β -1,3-glucano) que se producen como resultado de la modificación de las células de la epidermis (Gay & Woods, 1987).

1.2.2.6 Proteínas relacionadas con la patogénesis (PR)

Las proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) conforman un grupo variable que se acumula en las plantas durante y después de la infección por patógenos y, se caracterizan por su resistencia a las proteasas y su función permanece en ambientes con valores de pH extremos. Las proteínas PR se identificaron inicialmente en plantas de tabaco durante su interacción con el Virus de Mosaico del Tabaco; desde entonces estas proteínas se han identificado tanto en plantas dicotiledóneas como en monocotiledóneas. En la actualidad, solo se conocen las actividades definidas de algunas proteínas PR, e. g. las PR-2 (β -1,3-glucanasas) y PR-3 (quitinasas), lo que sugiere que la expresión de glucanasas y quitinasas durante la patogénesis tiene una función importante en el proceso de defensa vegetal. Se ha descrito que las plantas de trigo y arroz manipuladas genéticamente para sobreexpresar ciertas quitinasas son más resistentes a los hongos *Erysiphe graminis* y *Magnaporthe grisea*, respectivamente (Jones, 2000). A pesar de que algunas proteínas PR, como las PR-2 y PR-3, poseen actividad antimicrobiana, aún se desconoce la función que el resto de ellas tiene durante las respuestas de defensa a patógenos, y en particular a los virus (Bowles, 1990; Jones, 2000; Kiba et al., 2003).

1.2.2.7 Resistencia Sistémica Adquirida (SAR)

La inoculación localizada con patógenos virulentos y/o avirulentos capaces de producir lesiones necróticas, puede resultar en la inducción de una reacción de resistencia a un ataque subsecuente del patógeno. La SAR es una respuesta de defensa activa, sistémica, de amplio espectro, que se asocia a la expresión de genes PR. En la mayoría de los casos, la SAR es igualmente efectiva contra hongos,

bacterias, virus o nematodos, independientemente del organismo inductor. La manifestación de la SAR en la planta implica la existencia de un sistema de señales capaces de transmitirse a través de los tejidos. En general, la SAR requiere al ácido salicílico (SA) como molécula señal. Como respuesta al SA la proteína reguladora NPR1 se moviliza al núcleo celular, donde interacciona con los factores de transcripción de tipo TGA para inducir la expresión de genes de defensa y así, activar la SAR (Barker, 2000; Durrant & Dong, 2004).

1.2.2.8 Lipoxigenasas

Las lipoxigenasas son enzimas que pueden generar moléculas señal tales como el ácido jasmónico (JA), el jasmonato de metilo (MeJA) o los peróxidos lipídicos, las cuales pueden coordinar la amplificación de respuestas específicas. La actividad de las lipoxigenasas puede causar daños irreversibles a la membrana, ocasionando la fuga del contenido celular y, finalmente, la muerte celular. De forma alternativa, las reacciones catalizadas por estas enzimas pueden estar involucradas en la generación de componentes tóxicos volátiles y metabolitos secundarios derivados de ácidos grasos, que podrían atacar directamente al patógeno invasor (Van Loon, 1989).

1.3 ESTABLECIMIENTO DE LA INFECCIÓN

Una de las interacciones planta-patógeno más estudiadas ha sido la interacción planta-hongo. Dejando a un lado las especies que presentan diversos grados de simbiosis, como las micorrizas u otras interacciones mutualistas, existen numerosas especies de hongos parásitos y patógenos causantes de importantes enfermedades vegetales (Narayanasamy, 2001). Los hongos patógenos establecen una relación íntima y altamente específica con su planta hospedera. Durante el curso de la infección, los hongos utilizan sofisticados mecanismos de colonización, redireccionan el flujo de nutrientes en el tejido vegetal, alterando el crecimiento y el desarrollo de la planta. Durante el proceso de patogénesis, se observan cambios en la morfología del patógeno (Knogge, 1996; Balhadére & Talbot, 2000).

El proceso mediante el cual un hongo penetra al tejido vegetal se inicia con la secreción de un "coctel" de enzimas hidrolíticas, cuya composición varía dependiendo del tipo de interacción. Durante la penetración, las enzimas hidrolíticas y la respuesta de defensa vegetal generan fragmentos de las paredes celulares del hongo y de la misma planta (Deverall, 1977; Mendgen et al., 1996). Estos fragmentos pueden desencadenar una amplia gama de respuestas defensivas que frenan considerablemente el ingreso del patógeno. La rápida respuesta de las defensas de la planta da como resultado el desarrollo de estrategias por parte del hongo para suprimir o evitar estos mecanismos (Vidhyasekaran, 1988). Después de la penetración, el siguiente paso en la estrategia del hongo para colonizar una especie vegetal es la secreción de metabolitos fitotóxicos o de productos que actúen como fitorreguladores, manipulando así la fisiología vegetal en su beneficio. A este tipo de sustancias se les ha denominado fitotoxinas (Wood et al., 1992; Knogge, 1996).

1.4 FITOTOXINAS

En general, una fitotoxina se define como un metabolito secundario producido por un fitopatógeno, que afecta de manera adversa las funciones de la planta a bajas concentraciones (rango en μM) y que no tiene carácter enzimático u hormonal (Goodman et al., 1986; Huang, 2001).

Las fitotoxinas pueden actuar como factores de virulencia cuantitativos, ya que son responsables de la intensidad de los síntomas de la enfermedad, o como factores de patogenicidad, de manera cualitativa, al estar involucradas exclusivamente con el progreso de la enfermedad.

Uno de los principales mecanismos de defensa de la planta, la HR, está relacionada con el establecimiento de resistencia; sin embargo, algunos hongos necrotróficos o saprófitos facultativos utilizan la inducción de muerte celular en su beneficio. Con la secreción de metabolitos fitotóxicos, encargados de matar a las células de hospederos susceptibles y de mantener su propio ciclo de vida, estos hongos son capaces de infectar, colonizar y nutrirse de las plantas. En estos casos, la muerte celular está asociada a la susceptibilidad, mientras que la resistencia es mediada por la insensibilidad de la planta hospedera a los efectos de la fitotoxina. En algunos casos, la aplicación de una fitotoxina pura es suficiente para inducir la muerte celular en plantas susceptibles; estas fitotoxinas son absolutamente requeridas por el patógeno para infectar con éxito a hospederos susceptibles y son consideradas factores de compatibilidad (Briggs & Johal, 1994). En todos los casos conocidos a la fecha, un solo gen de la planta puede conferir una forma estable de resistencia (o susceptibilidad) a esta estrategia de infección por parte del patógeno. Mientras que los genes que están asociados con la producción de fitotoxinas en el hongo son numerosos. Por lo anterior, el modelo de interacción gen-a-gen no se aplica para explicar este tipo de interacción planta-hongo.

Las fitotoxinas se clasifican, de acuerdo con su especificidad y modo de acción en dos grupos: fitotoxinas hospedero selectivas (HSTs) y hospedero no selectivas (no-HSTs) (Wood et al., 1992).

1.4.1 Fitotoxinas Hospedero Selectivas (HSTs)

Las HSTs son tóxicas únicamente a los hospederos del patógeno que las produce, e inducen los síntomas de la enfermedad aún en ausencia del patógeno. En su mayoría, son consideradas como determinantes primarios de patogenicidad al ser requeridas por el patógeno para colonizar la planta y causar daño (Scheffer & Livingston, 1984).

Los géneros *Alternaria* y *Cochliobolus* incluyen especies que producen una amplia variedad de HSTs, y como resultado tienen un rango limitado de hospederos. Estas especies proveen un modelo único para entender la selectividad de hospedero y las estrategias empleadas por los patógenos para permitir la infección. Ambos géneros,

comprenden especies saprófitas, o aislados de una misma especie, los cuales no tienen plantas hospederas específicas. Sin embargo, no se conoce cómo las cepas patogénicas están relacionadas con las cepas saprófitas y qué causa sus diferentes estilos de vida. De un modo análogo, el rango de hospederos del hongo productor de fitotoxinas está limitado a variedades específicas de las especies hospederas y, en la mayoría de los casos, no se sabe cómo las fitotoxinas causan la muerte celular y cómo ciertas variedades son resistentes al hongo productor de HST. La relación entre el hongo productor de HST y su hospedero provee una oportunidad única para el estudio del origen y la evolución de patogenicidad en los hongos.

Entre las HSTs mejor estudiadas se encuentran aquellas producidas por especies del género *Alternaria* y, en particular, de *Alternaria alternata* y sus diferentes patotipos (o *formae speciales*); las HSTs incluyen a la toxina AAL, de *A. alternata* f.sp. *lycopersici*, la toxina AK, de *A. alternata* f.sp. *kikuchiana*, la toxina AM, de *A. alternata* f.sp. *mali*, la toxina AF, de *A. alternata* f.sp. *fragariae* y la toxina ACTG de *A. alternata* f.sp. *citri tangerine*. También, entre las HSTs producidas por patógenos del género *Cochliobolus*, están la toxina T de *C. heterostrophus*, la victorina de *C. victoriae* y la toxina HC de *C. carbonum* (Fig. 1.2) (Otani et al., 1995).

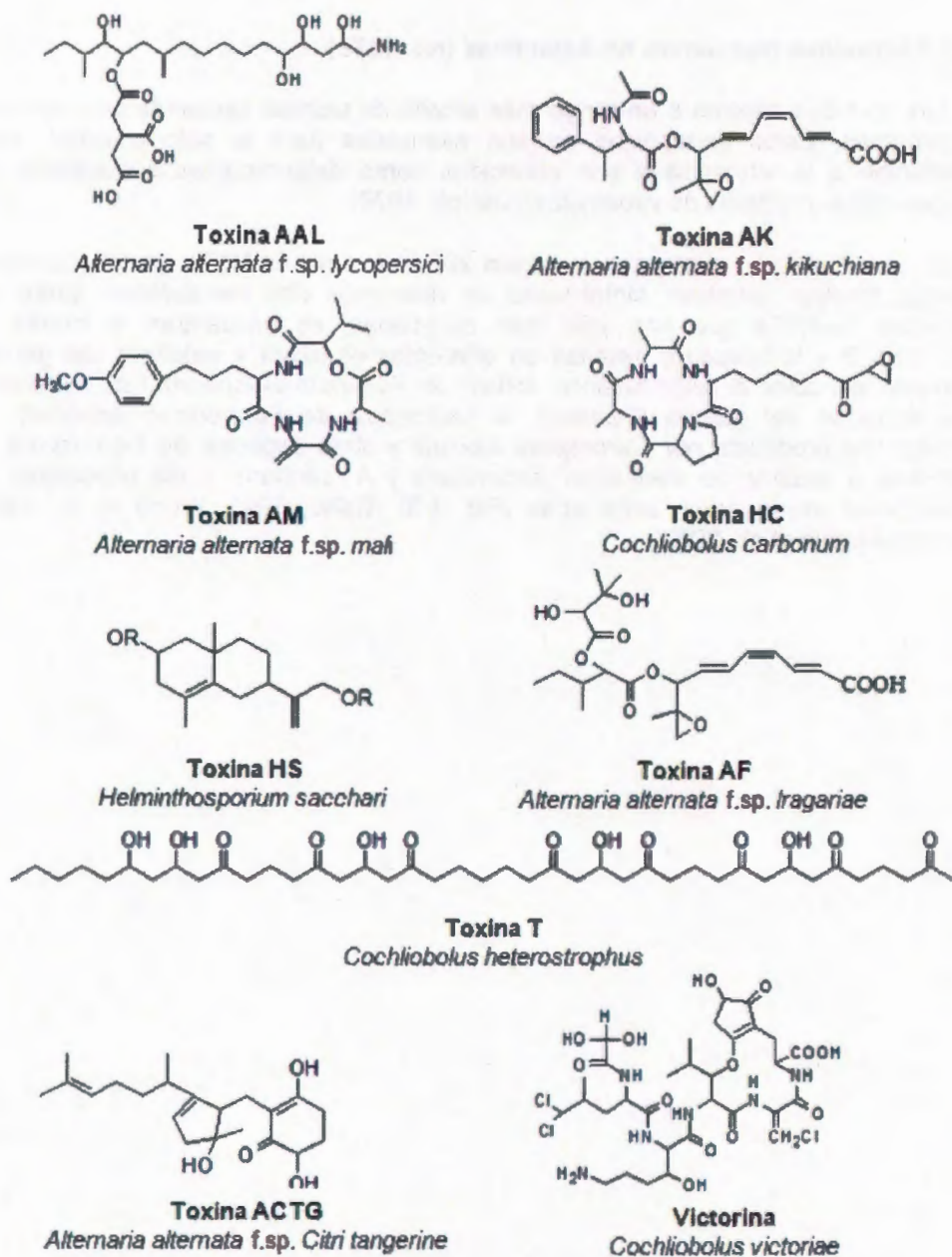
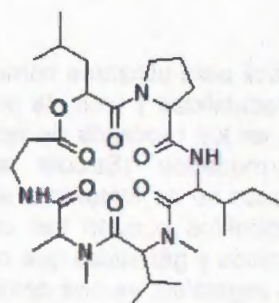


Figura 1.2. Ejemplos de fitotoxinas hospedero selectivas (HST).

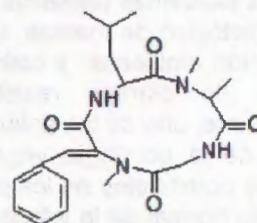
1.4.2 Fitotoxinas Hospedero no-Selectivas (no-HSTs)

Las no-HSTs afectan a un rango más amplio de plantas causando una variedad de síntomas. Estos metabolitos no son esenciales para la patogenicidad, pero contribuyen a la virulencia y son conocidos como determinantes secundarios de patogenicidad o factores de virulencia (Rudolph, 1976).

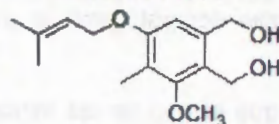
En la actualidad, se conocen al menos 200 fitotoxinas no-HSTs, pertenecientes a diversas familias químicas, sintetizadas en diferentes vías metabólicas. Entre las fitotoxinas no-HSTs que han sido más estudiadas, se encuentran el zinniol, la destruxina B y la tentoxina aisladas en diferentes especies y patotipos del género *Alternaria*; así como el ácido fusárico, aislado de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* y otras especies del género *Fusarium*; la fusicoccina de *Fusicoccum amygdali*, la cercosporina producida por *Cercospora kikuchii* y otras especies de *Cercospora*; la brefeldina A, aislada de *Penicillium decumbens* y *A. carthami*, y las ofiobolinas de *Cochliobolus miyabeanus*, entre otras (Fig. 1.3) (Ballio, 1991; Wood et al., 1992; Gamboa-Angulo et al., 2002).



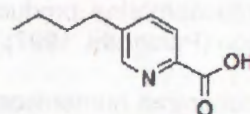
Destruxina B
Alternaria spp.



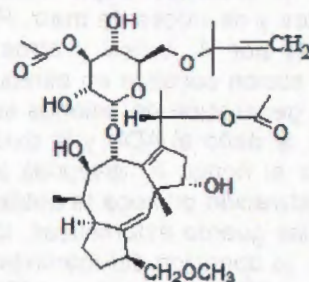
Tentoxina
Alternaria spp.



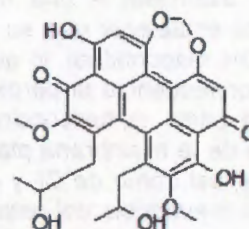
Zinniol
Alternaria spp.



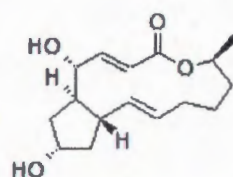
Ácido fusárico
Fusarium spp.



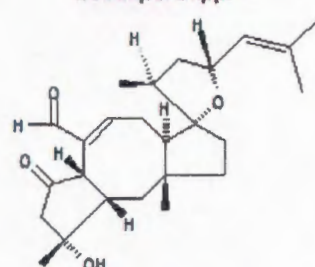
Fusicoccina
Fusicoccum y *Alternaria* spp.



Cercosporina
Cercospora spp.



Brefeldina A
Penicillium y *Alternaria* spp.



Ofiobolina A
Cochliobolus spp.

Figura 1.3. Ejemplos de fitotoxinas hospedero no selectivas (no-HST).

1.4.3 Aplicaciones de las fitotoxinas

Las fitotoxinas presentan un gran potencial para utilizarse como herbicidas en el control biológico de maleza, dada su biodegradabilidad y limitada contribución a la contaminación ambiental; y como herramientas en los procesos de selección *in vitro* de líneas de plantas resistentes a enfermedades (Strobel et al., 1991). Adicionalmente, una de las aplicaciones importantes de las fitotoxinas se encuentra en el campo de la patología vegetal. Estos metabolitos pueden ser utilizados como reguladores potenciales en los procesos bioquímicos y genéticos que ocurren durante el desarrollo normal de la infección de especies vegetales, ya sea como supresores o inductores de las respuestas de defensa (Haraguchi et al., 1996). Se ha reportado que la fitotoxina AK producida por *Alternaria kikuchiana*, suprime los mecanismos de defensa en las hojas de pera, demostrándose que estos mecanismos son inducidos por una glucoproteína producida por las esporas del patógeno al momento de su germinación (Panigrahi, 1997).

Se encuentran numerosos reportes en los que el uso de las fitotoxinas permiten descifrar algunos de los procesos bioquímicos involucrados en su mecanismo de acción. Se ha demostrado que la fitotoxina CBT (beticolina 1), producida por *Cercospora beticola*, inhibe el transporte de protones dependientes de ATP en vesículas microsomales de tallos de guisantes y de raíces de maíz. Por otra parte, el uso de alternasol A una no-HST producida por *A. solani* y otros patógenos, ha permitido establecer que su mecanismo de acción consiste en estimular la oxidación del NADH mitocondrial, lo que resulta en la generación de aniones superóxido y trae como consecuencia la peroxidación lipídica, el daño al ADN y la oxidación de tioles. Por otra parte, la fusicoccina producida por el hongo *F. amygdali* activa la enzima ATPasa de la membrana plasmática; esta activación provoca la entrada de K^+ y otros cationes, así como de Cl^- y agua a las células guarda estomáticas, lo que acarrea la apertura irreversible del estoma y, por tanto, la aparición del marchitamiento típico de la enfermedad de las hojas (Galum & Breiman, 1992; Wood et al., 1992).

1.5 MECANISMOS DE ACCIÓN DE METABOLITOS FITOTÓXICOS

1.5.1 Mecanismos y sitios de acción de no-HSTs

Los mecanismos por los que pueden actuar las diferentes no-HSTs son variados y la mayoría no se conocen con certeza. Las no-HSTs actúan afectando mecanismos específicos que ocurren ampliamente, si no de manera ubicua, en plantas. Algunas no-HSTs afectan enzimas, el metabolismo de ácidos nucleicos o del fenol, la regulación del crecimiento, en tanto que otras inhiben la síntesis de proteínas o de la clorofila, reducen el flujo hídrico, forman quelatos o ejercen alguna acción sobre membranas (Rudolph, 1976; Gay & Woods, 1987).

Algunas fitotoxinas presentan actividad sobre diferentes enzimas, aunque no muestren una inhibición específica. Entre los ejemplos de fitotoxinas que actúan a nivel enzimático está la rizobitoxina, producida por *Burkholderia andropogonis*, que inhibe de forma irreversible a la β -cistationasa de bacterias y plantas (Rudolph, 1976). Por otra parte, algunas no-HSTs como la tricodermina, el nivalenol y la verrucarina A, inhiben la síntesis de proteínas, con un alto grado de selectividad en la iniciación de cadenas polipeptídicas eucarióticas (Rudolph, 1976). La tentoxina (*A. alternata*), inhibe la fotofosforilación en los pasos terminales de la síntesis de ATP, originando plástidos deformados y una disminución del contenido de clorofila (Otani et al., 1995). El zinniol, el ácido fusárico, la citrina y las ofiobolinas A y B tienen su sitio de acción en la membrana plasmática; sus mecanismos de acción implican el aumento en su permeabilidad por la disrupción de membranas, ya sea por reducción del flujo a través de agujeros vasculares en el tallo o aumentando la viscosidad de la savia, creando una interferencia con la regulación de la respiración estomática (Ballio, 1991). La reducción del flujo hídrico está vinculada principalmente al tamaño de las moléculas y a su masa molecular. Por ejemplo, un glicopéptido inductor de marchitamiento de *Corynebacterium insidiosum* reduce significativamente la conductancia del tallo y se ha postulado que la toxina actúa por interferencia con el movimiento del agua a través de la membrana celular (Rudolph, 1976). Los efectos de diferentes no-HSTs sobre el crecimiento vegetal pueden ejemplificarse con la fusicoccina que estimula el intercambio hídrico y el alargamiento celular en explantes de hoja del chícharo (Ballio, 1991). Finalmente, se ha observado que algunas no HSTs como la licomarasmina y el ácido licomarásmico forman quelatos que se translocan y acumulan en las hojas, ocasionando un rápido incremento en el grado de respiración en tomate (Knoche & Duvick, 1987).

1.5.2 Mecanismos y sitios de acción de HSTs

Las HSTs han sido clasificadas como “determinantes de compatibilidad” y parecen mediar esta compatibilidad induciendo la muerte de la célula hospedera (Walton, 1996). Las fitotoxinas HST proveen un modelo adecuado para entender la especificidad de las interacciones planta-patógeno. La identificación de los genes requeridos para la biosíntesis de las HSTs muestra que éstos no siempre son exclusivos de la especie productora de la fitotoxina y que están agrupados en complejos *loci* que podrían ser requeridos para la transferencia genética horizontal (Wolpert et al., 2002). Muchas HSTs actúan dañando los procesos bioquímicos, en varios casos la muerte celular resultante tiene las características de una PCD (Walton, 1996; Wolpert et al., 2002). Esta habilidad de convertir tejido vivo en muerto ha permitido que los hongos saprófitos facultativos lleguen a ser fitopatógenos.

Las HSTs actúan principalmente sobre tres sitios primarios: la membrana plasmática, la mitocondria y el cloroplasto (Fig. 1.4) (Otani et al., 1995). El efecto de las HSTs sobre la membrana plasmática puede ocurrir mediante un incremento en la pérdida electrolítica en los tejidos, por invaginación o por inducción de la despolarización de la membrana. Este último efecto ha sido observado con toxinas del género *Alternaria* como las toxinas AK, AF y ACT (Rotem, 1994; Haraguchi et al., 1996).

El efecto de las HSTs sobre la mitocondria está dado por cambios ultraestructurales en el organelo que incluyen la turgencia, la reducción de su número, la vesiculación de las crestas y la disminución de la densidad electrónica en la matriz (Markham & Hille, 2001). Un ejemplo de estos efectos se observa con la toxina ACT, que incrementa el grado de oxidación del NADH e inhibe la oxidación de malato en las mitocondrias susceptibles. Después de afectar a estos organelos, la toxina induce un rápido incremento en la pérdida de electrolitos de los tejidos de la hoja, eventualmente provoca su necrosis (Scheffer & Livingston, 1984). En el cloroplasto, la fitotoxina AM induce una disociación y vesiculación de la grana e inhibe la fijación del CO₂ fotosintético (Wolpert et al., 2002).

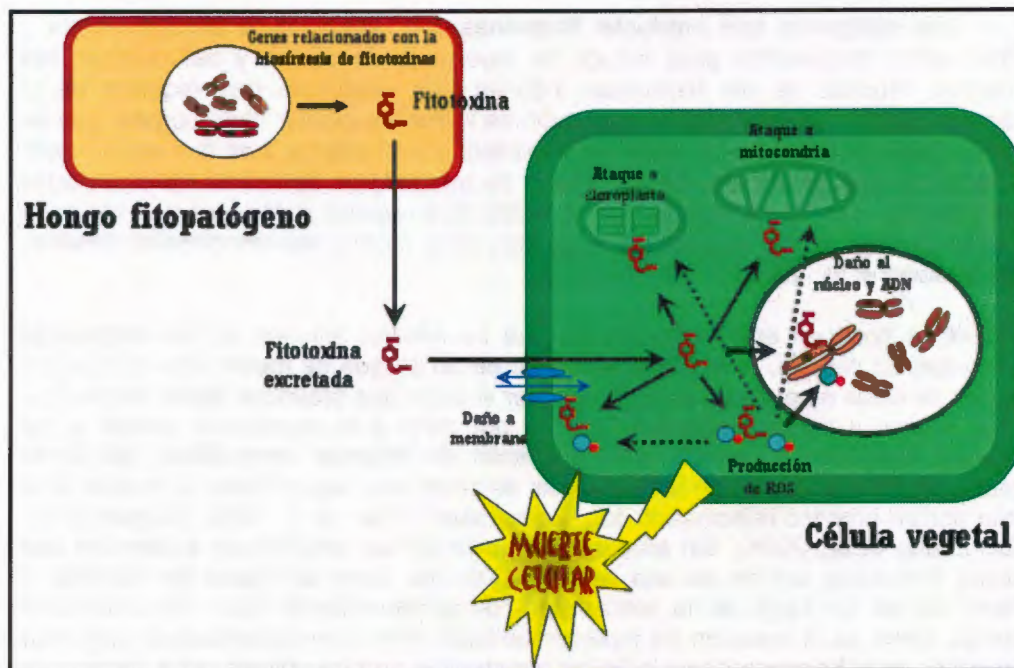


Figura 1.4 Interacción entre un hongo fitopatógeno productor de fitotoxinas y la célula vegetal hospedera. Principales sitios de acción de las fitotoxinas durante el establecimiento de la infección y algunas de sus respuestas por parte de la célula vegetal (adaptado de Walton, 1996; Wolpert et al., 2002).

1.5.3 Mecanismos de patogénesis relacionados con metabolitos fitotóxicos

Los patógenos que producen fitotoxinas son necrotróficos en su mayoría y utilizan estos metabolitos para inducir la muerte de la planta y así obtener sus nutrientes. Muchas de las fitotoxinas inducen una respuesta que requiere de la participación del hospedero en la regulación de la muerte celular. Esto sugiere que en muchos casos la fitotoxina no mata al hospedero por sí misma, sino que es el propio hospedero el que se suicida. La asociación de marcadores típicos de las respuestas de resistencia, con los de muerte celular, indica que algunos patógenos podrían estar tomando ventaja de las respuestas vegetales para facilitar su patogénesis (Walton, 1996; Wolpert et al., 2002).

Con base en estos estudios es que se infieren algunas de las respuestas observadas en plantas, como características de un ataque de metabolitos fitotóxicos. Algunas de estas respuestas están dadas por el daño que provocan estos metabolitos en las células y tejidos vegetales, ya sea por daño a la membrana celular, a los diferentes organelos celulares, a la inhibición de enzimas específicas, así como cambios a nivel del ADN o en la biosíntesis de proteínas, que provoca la muerte de la planta por un proceso relacionado con fitotoxicidad (Chen et al., 1992; Wolpert et al., 2002; Zhang et al., 2004). Sin embargo, también se han encontrado evidencias que muchas fitotoxinas actúan de una manera diferente, lejos del papel de “veneno” o “toxina” *per se*. Su papel se ha relacionado con la inducción de algún mecanismo de defensa, como es la reacción de hipersensibilidad (HR), que desencadena cascadas de eventos en el hospedero que lo llevan a matar sus propias células, para contener la infección, resultando benéfico para el patógeno y contrario para la planta (Walton, 1996; Gechev et al., 2004).

La inducción de mecanismos de defensa, como un aumento en la producción de ROS, ha sido encontrada en diferentes interacciones entre patógenos productores de fitotoxinas y su planta hospedera. Sin embargo, las respuestas y efectos dependen de manera directa de la fitotoxina. Por ejemplo, la cercosporina, una perilequinona producida por diferentes especies del género *Cercospora* como *C. beticola* y *C. kikuchii*, induce la formación de oxígeno singulete, y de superóxido en una reacción fotodinámica. Esta fitotoxina es un pigmento fotosensible que depende de la luz para inducir su efecto fitotóxico, el cual se relaciona con un daño a la membrana por la peroxidación de lípidos. Otras fitotoxinas cuyo efecto fitotóxico resulta de la inducción en la producción de ROS incluyen a las cebetinas, también producidas por el género *Cercospora* y a las altertoxinas del género *Alternaria*; en ambos casos, el efecto fitotóxico se relaciona con un daño a la membrana y a las ATPasas, como resultado de la formación de radicales libres que desencadenan una peroxidación de lípidos de membrana (Heiser et al., 1998).

Por otra parte, existen fitotoxinas que provocan un aumento en la producción de ROS, aunque esta respuesta se presenta como un efecto secundario de la inducción de la muerte celular, o como parte de otros mecanismos implicados con la

respuesta de la planta a algún tipo de estrés (Able, 2003). Una de estas fitotoxinas es la toxina AAL de *A. alternata* f.sp. *lycopercisi*, que induce una PCD durante la cual se registra un aumento en los niveles de ROS, vinculados con la diseminación de la señal de muerte celular y con el daño a nivel de membrana celular (Matkham & Hille, 2001).

Otro de los efectos que ha sido ampliamente vinculado con el daño producido por las fitotoxinas a las células hospederas, es el daño a la membrana y a la pared celular, detectado por la presencia de invaginaciones y una fuga de electrolitos, consecuencia del aumento en la permeabilidad (Wolpert et al., 2002).

La victorina (*Helminthosporium victoriae*) fue una de las primeras toxinas en ser evaluadas con respecto a posibles efectos a nivel estructural, observándose la presencia de plasmólisis en plantas susceptibles al patógeno. Por otra parte, se ha reportado que las toxinas AM y AK inducen invaginaciones en la membrana plasmática y la formación de papilas similares a las inducidas por la victorina (Wolpert et al., 2002), en tanto que la toxina AM induce una rápida fuga de electrolitos de células en manzana susceptible, tanto a la toxina como al patógeno *A. alternata* f.sp. *mali* (Rudolph, 1976). Finalmente, también se ha reportado que el ácido tenuazónico, una no-HST de *A. alternata* f.sp. *mali*, causa solamente pequeños incrementos en la permeabilidad, pero no induce invaginaciones en la membrana y que un efecto negativo sobre la plasticidad de la membrana y la presencia de una plasmólisis son el resultado de la interacción entre la fusicoccina en células del mesófilo de frijol (Rudolph, 1976; Huang, 2001).

Uno de los principales marcadores de patogénesis por parte de las fitotoxinas, está dado por la inducción de una muerte celular, la cual ocurre como consecuencia de un proceso relacionado con toxicidad, o como consecuencia de los mecanismos de defensa del hospedero que conducen a una PCD (Greenberg et al., 1994; Dangl et al., 1996; Greenberg, 1997; Gilchrist, 1998). Inicialmente, como resultado de estudios realizados principalmente con fitotoxinas no-HSTs, se consideró que los efectos de las fitotoxinas funcionaban solamente con una "intoxicación", que se reflejaba como un daño a nivel de la membrana plasmática, de organelos, contra enzimas, o directamente sobre el ADN y el núcleo celular (Gavrieli et al., 1992; Yao et al., 2001; van Baarlen, 2004). Sin embargo, el uso de fitotoxinas HST ha mostrado que éstas, presentan mecanismos de ataque que aprovechan los propios recursos de defensa y resistencia de la planta para inducir una PCD (Wang et al., 1996; Markham & Hille, 2001; Zhang et al., 2004). Dado que uno de los principales mecanismos de defensa vegetal es la HR que implica el sacrificar un cierto número de células para limitar la infección, tomando en cuenta que los patógenos productores de fitotoxinas HSTs son casi en su totalidad necrotróficos, la respuesta vegetal beneficia al patógeno ya que lo provee de nutrimentos necesarios para su desarrollo (Govrin & Levine, 2000; Wolpert et al., 2002).

1.6 EVALUACIÓN DEL PAPEL DE LOS METABOLITOS FITOTÓXICOS PRODUCIDOS POR HONGOS EN LA INTERACCIÓN PLANTA-PATÓGENO

La elucidación de los mecanismos mediante los cuales actúa una fitotoxina no permite necesariamente establecer cual es su papel en la patogénesis. Una de las principales omisiones al momento de evaluar las fitotoxinas es no considerar como actúan de manera conjunta con el resto de metabolitos que produce el patógeno (Wang et al., 1996; Tiedemann, 1997; Navarre & Wolpert, 1999; Asai et al., 2000; Tada et al., 2001). Se ha encontrado que los hongos fitopatógenos al ser cultivados *in vitro* producen una gran cantidad de metabolitos, algunos de ellos con actividad fitotóxica y/o con estructuras químicas, relacionadas. La mayoría de los trabajos dirigidos hacia el aislamiento e identificación de metabolitos fitotóxicos y la evaluación de su papel en el proceso infeccioso, utilizan una técnica de bioensayo simple (e.g. bioensayo de gota, de inmersión, fuga de electrolitos, etc.), para monitorear el proceso de purificación del metabolito responsable de la actividad detectada. Una vez que se ha logrado el aislamiento del metabolito con actividad fitotóxica, su papel en la interacción planta-patógeno es evaluado mediante ensayos a nivel de cultivos celulares *in vitro* o mediante estudios *in vivo* (Vidhyasekaran, 1988; Huang, 2001). Sin embargo, a menudo buscando establecer el papel y la importancia en la patogénesis de un metabolito fitotóxico, se le designa como un factor crítico en el establecimiento de la infección, después de evaluarlo en forma aislada y sin considerar que la producción de metabolitos secundarios en una interacción planta-patógeno, es compleja y diversa (Colmenares et al., 2002; Reino et al., 2004). Como ejemplo de la variedad de metabolitos que producen los fitopatógenos, se pueden mencionar los estudios con *A. alternata* f.sp. *lycopersici*, hongo fitopatógeno que infecta al tomate. La toxina AAL, es parte de un grupo de metabolitos estructuralmente relacionados a la esfingosina y a la esfinganina, conocido como el grupo de micotoxinas análogas de esfinganina (SAMs, por sus siglas en inglés); a este grupo pertenecen también las fumonisinas, producidas por hongos no relacionados con *Alternaria* como *Fusarium verticillioides* (syn. *F. moniliforme*) y otras especies de *Fusarium*. Es interesante mencionar que dos géneros tan diferentes entre sí, e.g. *Fusarium* y *Alternaria*, producen metabolitos fitotóxicos como fumonisina B1 y toxina AAL, con un mismo mecanismo de acción (inducción de apoptosis en células de mamíferos) (Chen et al., 1992).

En lo que respecta a estudios con toxinas no-HSTs, se ha reportado el aislamiento de diferentes metabolitos con actividad fitotóxica, producidos por un mismo patógeno, e.g. de *Mycosphaerella fijiensis*, patógeno en plátano (*Musa acuminata*) se han aislado metabolitos de naturaleza lipofílica como la juglona y tetralona (Sterlie et al., 1991); mientras que de *Alternaria tagetica*, patógeno de cempasúchil (*Tagetes erecta*), se han obtenido un número importante de metabolitos lipofílicos con actividad fitotóxica (Cotty et al., 1983; Cotty & Misaghi, 1984; Gamboa-Angulo et al., 2000, 2001 & 2002).

1.7 ESTUDIOS EN LA INTERACCIÓN *Alternaria tagetica*–*Tagetes erecta*

Los primeros reportes sobre el estudio de la interacción de *Tagetes* spp. y patógenos del género *Alternaria* fueron los de Dimock & Osborn en 1943; y en 1966, Shome & Mustafee identificaron al hongo causante de la enfermedad del "tizón" en *Tagetes* spp. y lo designaron con el nombre de *A. tagetica*. Los estudios posteriores se enfocaron principalmente a la identificación del patógeno y patogenicidad sobre especies del género *Tagetes*, particularmente *T. erecta* y *T. patula*. (Hotchkins & Baxter, 1983). La primera identificación de metabolitos fitotóxicos producidos por *A. tagetica* fue descrita por Cotty et al. (1983).

Recientemente se reportó que al extraer el filtrado de cultivo de *A. tagetica* con un disolvente de polaridad intermedia (acetato de etilo), tanto la fracción lipofílica (orgánica) como la hidrofílica (acuosa) mostraban una marcada actividad fitotóxica al ser evaluadas en el bioensayo de gota con hojas de *T. erecta*, sugiriendo la existencia de dos grupos de metabolitos fitotóxicos de importancia en la patogénesis del hongo (Gamboa-Angulo et al., 2002). Los estudios para identificar los metabolitos responsables de la actividad fitotóxica en filtrados de cultivo de *A. tagetica* se han centrado en la fracción lipofílica. Entre los metabolitos fitotóxicos lipofílicos detectados se incluyen el zinniol, reportado como una no-HST comúnmente producida por diferentes especies del género *Alternaria*, así como otros metabolitos derivados del zinniol entre los que se encuentran el éter metílico de 8-zinniol y un monoacetato de zinniol, la tagetolona, la tagetenolona y el tirosol (Fig. 1.5). De esta misma fracción se han reportado metabolitos que no presentan actividad fitotóxica contra hojas de *T. erecta*, identificados como el ácido *p*-hidroxibenzoico, un monoacetato de zinniol, dos dímeros de zinniol, dos ftálidos de zinniol y el éter 2-fenil de 8-zinniol (Gamboa-Angulo et al., 2000, 2001 & 2002; Arana-López et al., 2003). A la fecha, los metabolitos presentes en la fracción hidrofílica no han sido purificados o identificados.

Tomando como base los estudios realizados con *A. tagetica*, y considerando que la mayoría de los trabajos se evalúa a los metabolitos fitotóxicos de manera aislada, en este trabajo se planteó evaluar a nivel celular la actividad fitotóxica del filtrado del hongo y de las fracciones hidrofílica y lipofílica, así como determinar el efecto del filtrado y las fracciones en mecanismos de patogénesis como daño a la membrana celular, formación de ROS y daño a nivel de ADN nuclear. Esto con el fin de establecer para este modelo, si existe una respuesta diferencial para el filtrado y cada una de las fracciones o si la respuesta es específica, pero general, ofreciendo una nueva visión del posible papel de los metabolitos fitotóxicos en la patogénesis del hongo.

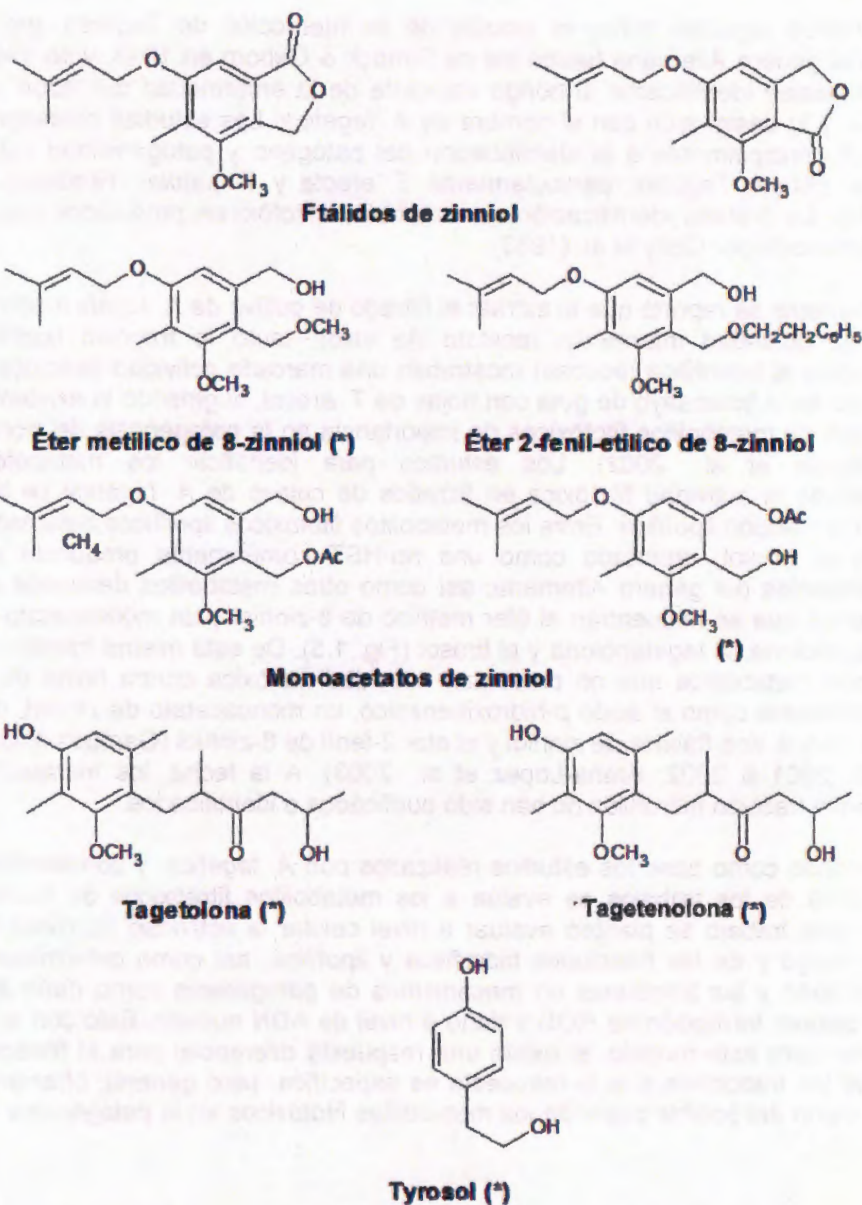


Figura 1.5. Metabolitos aislados de la fracción lipofílica de cultivos de *A. tagetica*. (*) Metabolitos fitotóxicos en hojas de *T. erecta*.

1.8 HIPÓTESIS

Dado que *Alternaria tagetica* produce dos grupos de fitotoxinas, hidrofílicas y lipofílicas, es factible que las diferentes fracciones fitotóxicas induzcan respuestas diferenciales en cultivos celulares de *Tagetes erecta*

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo general

Evaluar las respuestas vegetales relacionadas con los metabolitos fitotóxicos en la interacción *Alternaria tagetica* y *Tagetes erecta*, utilizando las fracciones fitotóxicas de *Alternaria tagetica* como herramienta

1.9.2 Objetivos específicos

Obtener las diferentes fracciones fitotóxicas producidas por *Alternaria tagetica* y la fitotoxina zinniol para las evaluaciones de patogénesis

Establecer cultivos de células en suspensión de *Tagetes erecta*

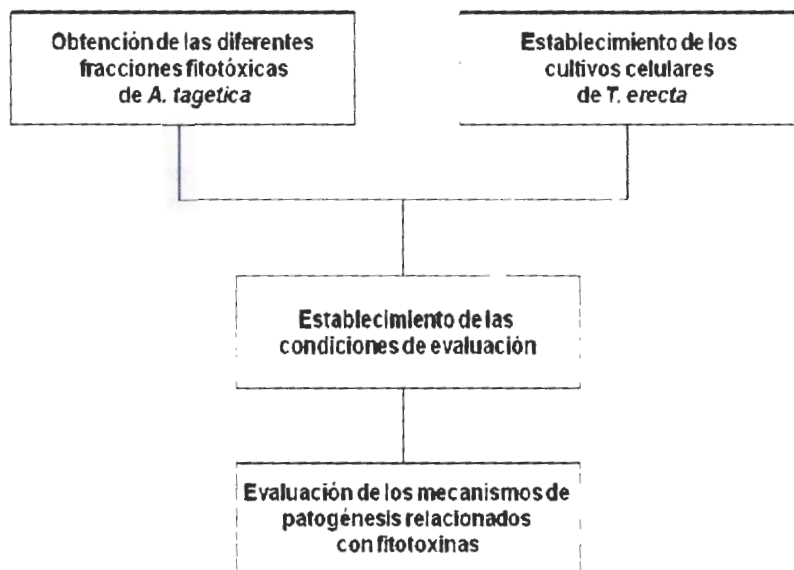
Evaluar la actividad fitotóxica de las diferentes fracciones de *A. tagetica*, en cultivos celulares de *T. erecta*

Evaluar la inducción del daño a la membrana celular y al ADN por las fracciones de *A. tagetica* en cultivos celulares de *T. erecta*

Estimar la formación de ROS como resultado de la acción de las diferentes fracciones fitotóxicas en cultivos celulares de *T. erecta*

1.10 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cumplir con los objetivos planteados se utilizó la siguiente estrategia experimental:



En los capítulos 2 y 3 se describe la obtención de las diferentes fracciones fitotóxicas y los cultivos celulares de *T. erecta*. El establecimiento de las condiciones de evaluación se detalla en el capítulo 4.

Los resultados de las evaluaciones de las fracciones fitotóxicas y del zinniol se presentan en los capítulos 5 y 6.

1.11 BIBLIOGRAFÍA

Able, A. (2003). *Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens*. Protoplasma, 221, 137-143.

Agrios, G. (1978). *Plant Pathology*. Academic Press, New York.

Arana-López, G., Gamboa-Angulo, M., García-Sosa, K., F. Escalante-Erosa and L.M. Peña-Rodríguez (2003). *A chemical study of the mycelium of A. tagetica*. Revista de la Sociedad de Química de México, 47, 303-306.

Asai, T., Stone, J., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., J. Sheen and F. Ausubel (2000). *Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways*. The Plant Cell, 12, 1823-1835.

Baker, B., Zambryski, P., B. Staskawicz and S.P. Dinesh-Kumar (1997). *Signaling in plant-microbe interactions*. Science, 276, 726-733.

Balhadère, P. and N. Talbot (2000). "Fungal pathogenicity-establishing infection", in: *Molecular Plant Pathology: Annual Reviews*. Dickinson, M. and Beynon, J. (eds.). CRC Press LLC, Boca Ratón, pp 1-25.

Ballio, A. (1991). *Non-host selective fungal phytotoxins: Biochemical aspect of their mode of action*. Experientia, 47, 783-790.

Barker, C. (2000). "Systemic acquired resistance", in: *Molecular Plant Pathology: Annual Reviews*. Dickinson, M. and Beynon, J. (eds.). CRC Press LLC, Boca Ratón, pp 198-217.

Birch, P., Avrova, A., Dellagi, A., Lacomme, C. S. Santa Cruz and G. Lyon (2000). "Programmed cell death in plants in response to pathogen attack", in: *Molecular Plant Pathology: Annual Reviews*. Dickinson, M. and Beynon, J. (eds.). CRC Press LLC. Boca Ratón, pp 175-197.

Bowles, D. (1990). *Defense-related proteins in higher plants*. Annual Review of Biochemistry, 59, 873-907.

Briggs, S. and G. Johal (1994). *Genetic patterns of plant host-parasite interactions*. Trends in Genetic, 10, 12-16.

Buchanan, B., W. Guissem and R. Jones (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Biologists, Rockville.

Chen, H., Mirocha, C., Xie, W., L. Hogge and D. Olson (1992). *Production of the mycotoxin fumonisina B1 by Alternaria alternate f. sp. lycopersici*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 3928-3931.

Colmenares, A., Aleu, J., Duran-Patrón, R, I. Collado and R. Hernández-Galán (2002). *The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of Botrytis cinerea*. Journal of Chemical Ecology, 28, 997-1005.

Cotty, P., J. Misaghi and R. Hine (1983). *Production of zinniol by Alternaria tagetica and its phytotoxic affect on Tagetes erecta*. Phytopathology, 73, 1326-1328.

Cotty, P. and J. Misaghi (1984). *Zinniol production by Alternaria species*. Phytopathology, 74, 785-788.

Dangl, J., R. Dietrich and M. Richberg (1996). *Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions*. The Plant Cell, 8, 1793-1807.

De Gara, L., M. De Pinto and F. Tommasi (2003). *The antioxidant systems vis-à-vis reactive oxygen species during plant-pathogen interaction*. Plant Physiology and Biochemistry, 41, 863-870.

Deverall, B. (1977). *Defense Mechanism of Plants*. Cambridge University Press, Cambridge.

Dimock, A. and J. Osborn (1943). *An Alternaria disease of Zinnia*. Phytopathology, 33, 372-381.

Durrant, W. and X. Dong (2004). *Systemic acquired resistance*. Annual Review of Phytopathology, 42, 185-209.

Galum, E. and A. Breiman (1992). "Quantitative assays of phytotoxins using plant protoplasts and isolated cells", in: *Plant Toxins Analysis*. Linskens, H.F. and Jackson, J.F. (Eds.) Springer-Verlag, New York, pp 33-50.

Gamboa-Angulo, M., Alejos-González, F., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2000). *Novel dimeric metabolites from Alternaria tagetica*. Journal of Natural Products, 63, 1117-1120.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2001). *Tagetolone and tagetenolone: two phytotoxic polyketides from Alternaria tagetica*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1228-1232.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2002). *Natural zinniol derivates from*

Alternaria tagetica. Isolation, synthesis, and structure-activity correlation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 1053-1058.

Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. Ben-Sasson (1992). *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. *Journal of Cell Biology*, 11, 493-501.

Gay, J. and A. Woods (1987). "Induced modification in the plasma membranes of infected cell", in *Fungal Infection of Plants. Symposium of the British Mycological Society*. Pegg, G. and Ayres, P. (eds.) Cambridge University Press, Cambridge, pp 79-91.

Gechev, T., I. Gadjev and J. Hille (2004). *An extensive microarray analysis of AAL-toxin-induced cell death in Arabidopsis thaliana brings new insights into the complexity of programmed cell death in plants*. *Cellular and Molecular Life Science*, 61: 1185-1197.

Gilchrist, D. (1998). *Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide*. *Annual Review of Phytopathology*, 36: 59-90.

Goodman, R., Z. Király, and K. Wood (1986). *The biochemistry and physiology of plant disease*. University of Missouri Press. Columbia.

Goodman, R. and A. Novacky (1994). *The Hypersensitive Reaction in Plants to Pathogens. A Resistance Phenomenon*. APS Press. Minnesota.

Govrin, E. and A. Levine (2000). *The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea*. *Current Biology*, 10, 751-757.

Grant, J. and G. Loake (2000). *Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in resistance*. *Plant Physiology*, 124, 21-29.

Greenberg, J., Guo, A., D. Klessig and F. Ausubel (1994). *Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions*. *Cell*, 77, 551-563.

Greenberg, J. (1997). *Programmed cell death in plant-pathogen interaction*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 525-545.

Greenberg, J. and N. Yao (2004). *The role and regulation of programmed cell death in pathogen interactions*. *Cellular Microbiology*, 6, 201-211.

Hahn, M., Bucheli, P., Ceivoni, F., Donies, S., O'Neill, R., A. Darvill and P. Albersheim (1989). "Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interaction", in: *Plant-Microbe Interaction. Molecular and Genetic Perspectives*. Kosuge, T. and Nester, E. (eds.). McGraw-Hill Publishing Company, New York, pp 131-181.



- Hammerschmidt, R. (1999). *Phytoalexins: What have we learned after 60 years?* Annual Review of Phytopathology, 37, 285-306.
- Haraguchi, H., Abo, T., Fukuda, A., N. Okumura and A. Yagi (1996). *Mode of phytotoxic action of altersolanols*. Phytochemistry, 43, 989-992.
- Heath, M. (2000). *Non-host resistance and nonspecific plant defenses*. Current Opinion in Plant Biology, 3, 315-319.
- Heiser, I., W. Oßwald and F. Elstner (1998). *The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins*. Plant Physiology and Biochemistry, 36, 703-713.
- Hotchkiss, E. and L. Baxter Jr. (1983). *Pathogenicity of Alternaria tagetica on Tagetes*. Plant Disease, 67, 1288-1290.
- Huang, J-S (2001). *Plant pathogenesis and resistance*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Hutchenson, S. (1999). *Current concepts of active defense in plants*. Annual Review of Phytopathology, 37, 473-491.
- Jackson, A. and C. Taylor (1996). *Plant-microbe interactions: Life and death at the interface*. The Plant Cell, 8, 1651-1668.
- Jones, D. (2000). "Resistance genes and resistance protein function", in: *Molecular Plant Pathology: Annual Reviews*. Dickinson, M. and Beynon, J. (Eds.) CRC Press LLC, Boca Ratón, pp 108-143.
- Keen, N. (1990). *Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions*. Annual Review of Genetic, 24, 447-463.
- Kiba, A., Tomiyama, H., Takahashi, H., Hamada, H., Ohnishi, K., T. Okuno and Y. Hikichi (2003). *Induction of resistance and expression of defense-related genes in tobacco leaves infiltrated with Ralstonia solanacearum*. Plant and Cell Physiology, 44, 287-295.
- Knoche, H. and J. Duvick (1987). "The role of fungal toxins in plant disease", in: *Fungal Infection of Plants. Symposium of the British Mycological Society*. Pegg G. and Ayres, P. (Ed.) Cambridge University Press, Cambridge, pp 158-192.
- Knogge, W. (1996). *Fungal infection of plant*. The Plant Cell, 8, 1711-1722.
- Manners, J. (1993). *Principles of plant pathology*. Cambridge University Press, Cambridge.

- Markham, J. and J. Hille (2001). *Host-selective toxins as agents of cell death in plant-fungus interactions*. Molecular Plant Pathology, 2, 229-239.
- Mendgen, K., M. Hahn and H. Deising (1996). *Morphogenesis and mechanisms of penetration of plant pathogenic fungi*. Annual Review of Phytopathology, 34, 67- 383.
- Morel, J. and J. Dangi (1997). *The hypersensitive response and the induction of cell death in plants*. Cell Death and Differentiation, 4, 671-683.
- Narayanasamy, P. (2001). Plant pathogen detection and disease diagnosis. Marcel Dekker Inc., New York.
- Navarre, D. and T. Wolpert (1999). *Victorin induction of an apoptotic /senescence-like response in oats*. The Plant Cell, 11, 237-249.
- Otani, H., M. Kodama and K. Kohmoto (1995). "Physiological and molecular aspects of *Alternaria* host-specific toxin and plant interactions", in: *Molecular Aspects of Pathological Resistance: Require Signal Transduction*. Mills, D. (ed.). APS Press, Minnesota, pp 257-267.
- Overmyer, K., M. Brosché and J. Kangasjärvi (2003). *Reactive oxygen species and hormonal control of cell death*. Trends in Plant Science, 8, 335-342.
- Panigrahi, S. 1997. "Alternaria toxins", in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants*. Felix, J.P. (ed.) CRS Press, Boca Ratón, pp 319-336.
- Parker, J. (2000). "Signalling in plant disease resistance", in: *Molecular Plant Pathology: Annual Reviews*. Dickinson, M. and Beynon, J. (eds.) CRC Press LLC, Boca Ratón, pp 144-174.
- Pellinen, R., Korhonen, M., Tauriainen, A., E. Tapio and J. Kangasjärvi (2002). *Hydrogen peroxide activates cell death and defense gene expression in birch*. Plant Physiology, 130, 549-560.
- Prell, H. and P. Day (2001). Plant-Fungal Pathogen Interaction. Springer-Verlag, New York.
- Reino, J., Hernandez-Galan, R., R. Duran-Patron and I. Collado (2004). *Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus Botrytis cinerea*. Journal of Phytopathology, 152, 563-566.
- Rotem, J. (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, epidemiology, and pathogenicity. APS Press, Minnesota.

Rudolph, K. (1976). "Non-specific toxins", in: *Encyclopedia of Plant Physiology., New Series 4: Physiological Plant Pathology*. Heitefuss, R. and Williams, P. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp 270-315.

Sagi, M. and R. Fluhr (2001). *Superoxide production by plant homologues of the gp^{91(phox)} NADPH oxidase: modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection*. *Plant Physiology*, 126, 1281–1290.

Scheffer, R. and R. Livingston (1984). *Host selective toxins and their role in plant diseases*. *Toxicology*, 100, 17-21.

Scheffer, R. (1991). *Role of toxins in evolution and ecology of plant pathogenic fungi*. *Experientia*, 47, 804-811.

Simon-Plas F., T. Elmayan and J. Blein (2002). *The plasma membrane oxidase NtrbohD is responsible for AOS production in elicited tobacco cells*. *The Plant Journal*, 31, 137–147.

Sterlie, A., Upadhyay, J., Hershenhorn, G., G. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of Mycosphaerella fijiensis, the causative agent of Black Sigatoka disease of bananas and plantains*. *Experientia*, 47, 853-859.

Strobel, G., Kenfield, D., Bunkers, G., F. Sugawara and J. Clardy (1991). *Phytotoxins as potential herbicides*. *Experientia*, 47, 819-827.

Tada, Y., Hata, S., Takata, Y., Nakayashiki, H., Y. Tosa and S. Mayama (2001). *Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14, 477-486.

Tiedemann, A. (1997). *Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 151–166.

Van Baarlen, P. M. Staats and J. van Kan (2004). *Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen Botrytis elliptica*. *Molecular Plant Pathology*, 5, 559–574.

Van Kan, J. (2006). *Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen*. *Trends in Plant Science*, 11, 247-253.

Van Loon, L. (1989). "Stress in infected plants", in: *Plant-Microbe Interaction. Molecular and Genetic Perspectives*. Kosuge, T. and Nester, E. (Eds.) McGraw-Hill Publishing Company, New York.

Vidhyasekaran, P. (1988). *Physiology of Disease Resistance in Plant*. CRC Press, Boca Ratón.

Walton, J. (1996). *Host-selective toxins: agents of compatibility*. The Plant Cell, 8, 1723–1733.

Wang, H., Li, J., R. Bostock and D. Gilchrist (1996). *Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development*. The Plant Cell, 8, 375-391.

Wojtaszek, P. (1997). *Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection*. Biochemical Journal, 322, 681-692.

Wolpert, T., L. Dunkle and L. Ciuffetti (2002). *Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name?* Annual Review of Phytopathology, 40, 251–285.

Wood, R., A. Ballio and A. Graniti (1992). *Phytotoxins in Plant Diseases*. Academic Press, London.

Yao, N., Tada, Y., Park, P., Nakayashiki, H., Y. Tosa and S. Mayama (2001). *Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats*. The Plant Journal, 28, 13-26.

Zhang, H., Zhang, X., Mao, B., Q. Li and Z. He (2004). *Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice*. Cell Research, 14, 27-33.

Capítulo 2

Obtención de las fracciones fitotóxicas de cultivos de *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee

2.1 INTRODUCCIÓN

Alternaria tagetica es un hongo fitopatógeno que infecta *Tagetes erecta* y *T. patula*, produciendo metabolitos con actividad fitotóxica en las hojas de su planta hospedera (Cotty & Mishagi, 1983; Hotchkiss & Baxter, 1983; Cotty & Misaghi, 1984; Tomiaka et al., 2000). Se ha descrito que tanto en el filtrado de cultivos de *A. tagetica*, como en las fracciones resultantes de la extracción del filtrado acuoso con un disolvente de polaridad intermedia (acetato de etilo), se encuentran metabolitos con actividad fitotóxica en hojas de *T. erecta*, que podrían estar involucrados en la patogénesis de *A. tagetica* (Gamboa-Angulo et al., 2000, 2001 & 2002; Morales, 2003). Con base en estos estudios, en el presente trabajo se planteó la hipótesis de que al separar los metabolitos presentes en el filtrado de cultivos *in vitro* de *A. tagetica* de acuerdo a su naturaleza química, y que al evaluar las fracciones resultantes en cultivos celulares de la planta hospedera, los diferentes grupos de metabolitos pueden inducir respuestas diferenciales en los mecanismos de patogénesis y de defensa vegetal relacionados con fitotoxinas. Para demostrar lo anterior, fue necesario obtener el filtrado conteniendo los metabolitos totales liberados por el hongo al medio de cultivo y obtener posteriormente a partir de éste, las fracciones hidrofílica y lipofílica.

En este capítulo se describe la obtención de diferentes fracciones fitotóxicas y la evaluación de su actividad fitotóxica en hojas de *T. erecta*. Los metabolitos fitotóxicos totales, presentes en el filtrado de cultivo del hongo, fueron designados como **Fracción A**, en tanto que los metabolitos de naturaleza hidrofílica se denominaron como **Fracción B**, y los de naturaleza lipofílica como **Fracción C**. en este estudio el zinniol (**Fracción D**), se obtuvo de manera semi-sintética y se utilizó como una referencia.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Aislamiento de *A. tagetica*

Se empleó una cepa certificada de *Alternaria tagetica* (ATCC 58771). A partir de cultivos "padres", se preparó "semilla" de *A. tagetica* en cajas de Petri con agar V8 que se dejaron durante 15 días en condiciones de fotoperíodo natural y a 25 °C en espera de su esporulación. Una vez transcurrido este tiempo, se preparó una suspensión de esporas (aproximadamente 1.2×10^6 esporas·mL⁻¹) y se inoculó en hojas de plantas de *T. erecta*. Después de 5 días, las hojas que mostraron los síntomas de la infección, se observaron al estereoscopio en busca de esporas. A partir de éstas, se obtuvieron cultivos monoespóricos, que se emplearon para preparar nuevos cultivos "padres" (Gamboa-Angulo et al., 2002; Morales, 2003).

2.2.2 Material vegetal

Se emplearon plantas de *T. erecta* de 6-8 semanas, cultivadas en el vivero del CICY y trasplantadas en macetas 15 días previos a la inoculación. Para el bioensayo de gota se utilizaron hojas de *T. erecta* de plantas en maceta de la misma edad (6-8 semanas).

2.2.3 Cultivo masivo y obtención de las diferentes fracciones fitotóxicas

De un cultivo "padre" se prepararon "semillas" en cajas de Petri, con agar-jugo V8. Las cajas se incubaron a 26 °C, con fotoperíodo natural, durante 15 días. Después de este tiempo, se preparó una suspensión de esporas agregando 1 mL de agua estéril a cada placa y la suspensión se inoculó en un litro de medio de cultivo CET (ácido casamino enriquecido con infusión de hojas de *Tagetes*) contenido en un matraz de fondo plano. Los cultivos en medio líquido se incubaron en condiciones estacionarias durante 28 días, a 26 °C, bajo luz natural.

Al finalizar el período de cultivo del hongo, el micelio se separó de la fase líquida por filtración a través de papel toalla. El micelio se congeló, y el medio de cultivo filtrado se procesó de inmediato (**Fracción A**). La mitad del volumen del filtrado acuoso se extrajo con acetato de etilo (x3, 1: 1, v:v) y la fase orgánica resultante se concentró a presión reducida, obteniéndose el extracto orgánico crudo o fracción lipofílica (**Fracción C**) y la fase acuosa residual o fracción hidrofílica (**Fracción B**) (Fig. 2.1).

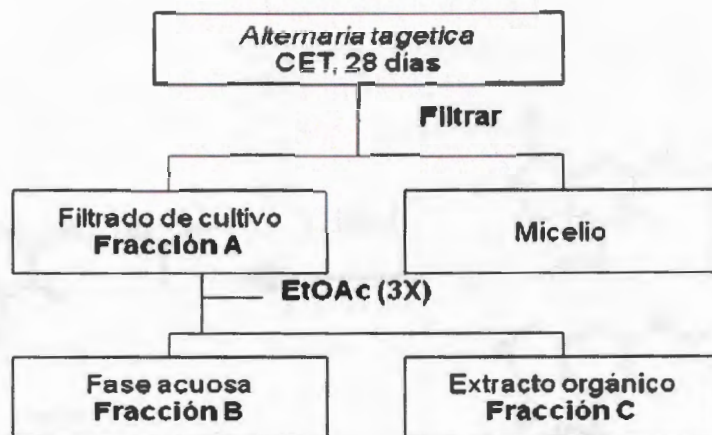


Figura 2.1. Esquema de obtención de las fracciones fitotóxicas.

2.2.4 Preparación de zinniol semi-sintético (Fracción D)

Para la preparación semi-sintética de zinniol se utilizaron los ftálidos de zinniol, previamente purificados de cultivos de *A. tagetica* (Gamboa-Angulo et al., 2002), como materia prima. Después de montar un equipo de reacción a reflujo, en atmósfera de nitrógeno, se disolvieron 20 mg de ftálidos de zinniol en éter etílico anhidro en un matraz de tres bocas de 50 mL. Se agregaron 40 mg de hidruro de litio-aluminio (LiAlH_4) al matraz de reacción y la mezcla se dejó en agitación constante y a reflujo durante 30 min. Transcurrido el tiempo se confirmó el consumo de la materia prima por cromatografía en capa delgada (TLC) y se procedió a recuperar el producto de reducción. La mezcla de reacción se diluyó con una mezcla de etanol/agua (9:1) para inactivar el LiAlH_4 , y la suspensión resultante se filtró, eliminando el disolvente a presión reducida. El zinniol se purificó del producto de reacción por TLC preparativa utilizando gel de sílice como fase estacionaria y éter etílico anhidro como fase móvil. De esta forma se obtuvieron 10 mg (49.26 % de rendimiento) de zinniol crudo, identificado por comparación directa en TLC y HPLC con una muestra auténtica (Fig. 2.2).

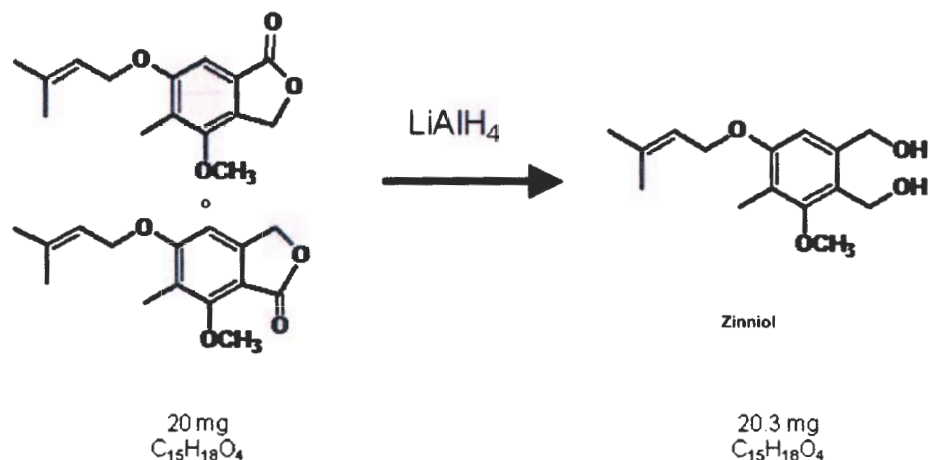


Figura 2.2. Esquema de reacción de la reducción de ftálicos de zinniol a zinniol.

2.2.5 Evaluación de actividad fitotóxica en hoja (bioensayo de gota)

Hojas aparentemente sanas de *T. erecta* se limpiaron y desinfectaron superficialmente y se colocaron en cajas de Petri con papel filtro humedecido para mantener una cámara húmeda. Las muestras se prepararon a una concentración de 4% en una mezcla de diclorometano-metanol (3:1) y se aplicaron sobre una superficie de 0.25 cm^2 de gel de sílice. Con un pincel se realizaron dos lesiones ligeras en cada hoja, y sobre cada lesión se aplicó una gota de $20 \mu\text{L}$ de agua destilada; enseguida, sobre cada gota se incorporó la gel de sílice impregnada con la muestra ($40 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$). Las hojas se dejaron a temperatura ambiente por 72 horas. Transcurrido el tiempo, se lavaron las hojas y se compararon con los controles. Como control se utilizó gel de sílice impregnada con el disolvente (Morales, 2003).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Infección de plantas de *T. erecta* con *A. tagetica*

Siguiendo el protocolo de reinfección previamente descrito se aisló la cepa de *A. tagetica* a partir de plantas infectadas; partiendo de los cultivos monoespóricos, se prepararon cultivos "padres" en tubos inclinados con agar V8.

2.3.2 Cultivo masivo de *A. tagetica* y obtención de las diferentes fracciones fitotóxicas

Se realizaron cultivos masivos de *A. tagetica* en medio de cultivo CET y después de 28 días se cosecharon. El cultivo fue filtrado para separar el micelio de la fase líquida y esta última se concentró a presión reducida a una décima parte de su volumen original. El filtrado concentrado se liofilizó y se resuspendió en agua destilada a una concentración de 25% (w/v). Esta fracción (**Fracción A**), que contiene todos los metabolitos fitotóxicos liberados al medio, fue extraída con un disolvente de polaridad intermedia (acetato de etilo), obteniéndose una fase orgánica, lipofílica y una fase acuosa, hidrofílica. A la fase acuosa resultante se le eliminaron las trazas de disolvente y se concentró a presión reducida, a un décimo de su volumen original, obteniéndose un rendimiento de aproximadamente $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La fase acuosa concentrada se liofilizó y resuspendió en agua destilada a una concentración de 25% (w/v) (**Fracción B**), obteniéndose un rendimiento ca $99.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. La fase orgánica fue concentrada a presión reducida, para obtener el extracto orgánico crudo (**Fracción C**), obteniendo un rendimiento aproximado de $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

2.3.3 Obtención de zinniol semi-sintético

El zinniol se preparó empleando ftálicos de zinniol como materia prima e hidruro de litio-aluminio como agente reductor. La identificación del zinniol obtenido de esta manera, se confirmó al comparar por TLC y HPLC el producto de reacción, con una muestra auténtica. El zinniol se denominó como **Fracción D** y se usó como referencia para los estudios de evaluación de patogénesis.

2.3.4 Evaluación de la actividad fitotóxica de las fracciones A, B, C y D

Una vez obtenidas las diferentes fracciones fitotóxicas, éstas fueron evaluadas en el bioensayo de gota para comprobar su actividad fitotóxica en hojas de *T. erecta*. Los resultados mostraron diferentes niveles de actividad (Cuadro 2.1). En el caso de los metabolitos lipofílicos (**Fracción C**) se observó una mayor actividad fitotóxica a una concentración menor de 4%, en tanto que zinniol mostró actividad fitotóxica a una concentración de 0.25%. Para las **Fracciones A y B** se necesitaron concentraciones más elevadas (25%) para observar una actividad fitotóxica marcada y evidente (Figs. 2.3 y 2.4).

Cuadro 2.1. Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas de cultivo de *A. tagetica* en hojas de *T. erecta*. Las hojas de *T. erecta* desinfestadas se inocularon con las fracciones fitotóxicas impregnadas en gel de sílice y se mantuvieron en una cámara húmeda por 72 h. Transcurrido el tiempo, se compararon las hojas tratadas con los controles, tomando el daño en la hoja control como "sin actividad" y la hoja con el mayor área de daño como "máxima actividad". (-): sin actividad, (+): ligeramente activo, (++) : activo, (+++) : actividad moderada, (++++): máxima actividad.

Fracción	Concentración	Actividad
0	(-)	(-)
A	5%	+
	25%	++++
B	5%	+
	25%	+++
C	1%	++
	4%	+++
D	0.15%	++
	0.25%	+++

Los experimentos se realizaron por duplicado con 3 hojas replicas para cada fracción fitotóxica y cada concentración, los resultados fueron similares en ambas repeticiones. (0): Control, agua destilada, (A): Fracción A, (B): Fracción B, (C): Fracción C y (D): Fracción D, zinniol.

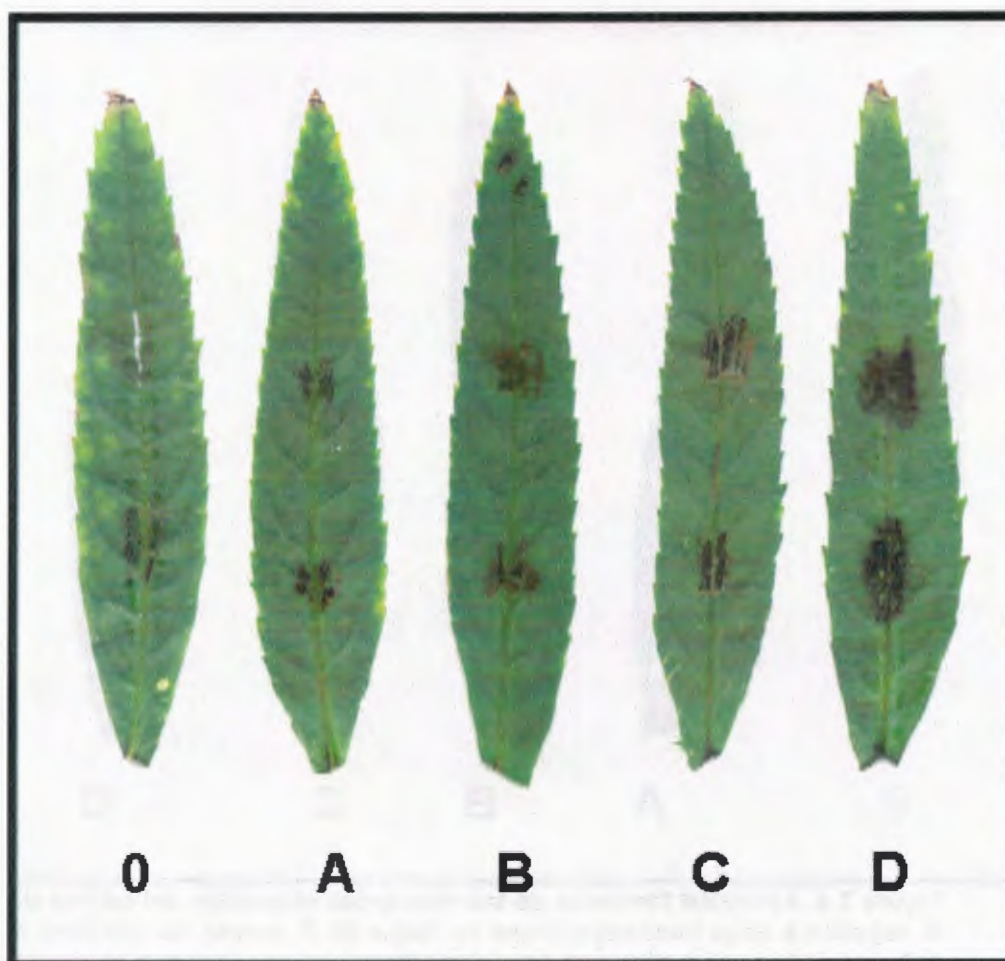


Figura 2.3. Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas del cultivo de *A. tagetica* a bajas concentraciones en hojas de *T. erecta*. Se comparó el daño inducido por las diferentes fracciones fitotóxicas con respecto al control. Los experimentos se realizaron por duplicado con 3 hojas réplicas para cada fracción fitotóxica y cada concentración, los resultados fueron similares en ambas repeticiones, se muestran las hojas representativas de los experimentos. (0) Control, agua destilada, (A): **Fracción A, 5%**, (B): **Fracción B, 5%**, (C): **Fracción C, 1%** y (D): **Fracción D, zinniol, 0.25%**.

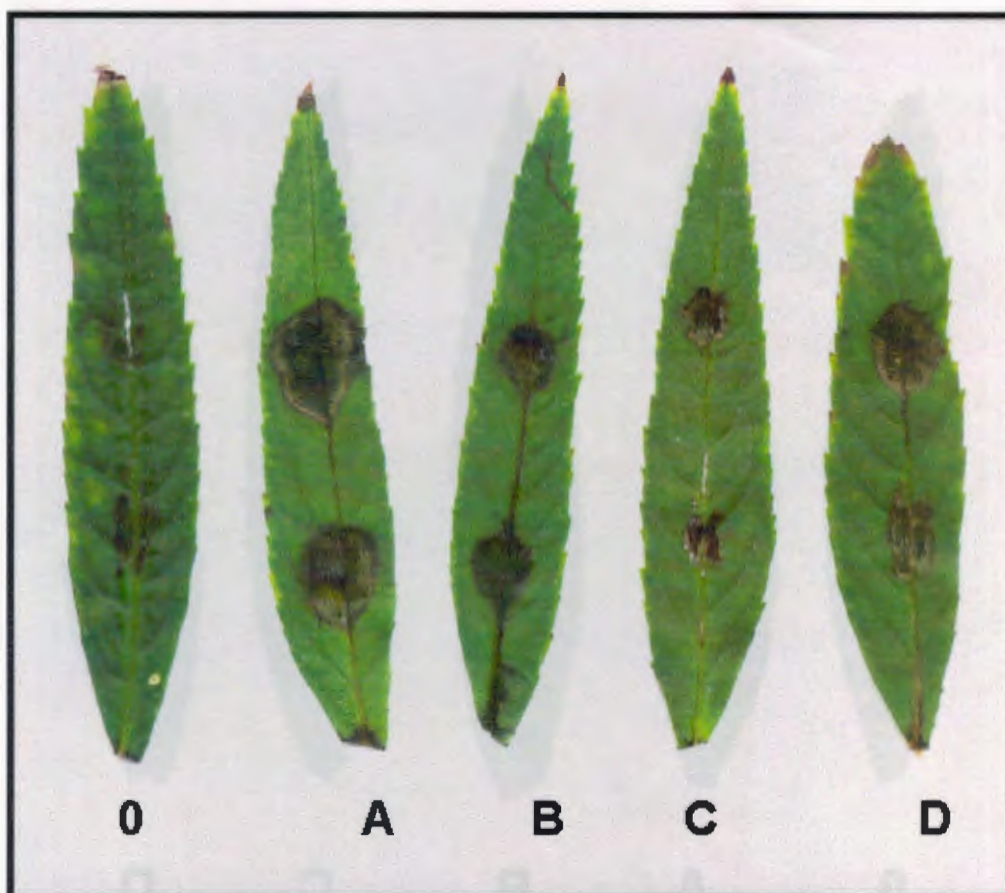


Figura 2.4. Actividad fitotóxica de las fracciones obtenidas del cultivo de *A. tagetica* a altas concentraciones en hojas de *T. erecta*. Se comparó el daño inducido por las diferentes fracciones fitotóxicas con respecto al control. Los experimentos se realizaron por duplicado con 3 hojas replicas para cada fracción fitotóxica y cada concentración, los resultados fueron similares en ambas repeticiones, se muestran las hojas representativas de los experimentos. (0) Control, agua destilada, (A): **Fracción A**, 25%, (B): **Fracción B**, 25%, (C): **Fracción C**, 4% y (D): **Fracción D**, zinniol, 0.5%.

2.4 CONCLUSIONES

Se logró comprobar la patogenicidad de la cepa de *Alternaria tagetica* empleada, en las plantas de *Tagetes erecta*, y se realizó su reaislamiento a partir de tejido infectado.

Se logró la síntesis y purificación de zinniol a partir de precursores naturales.

Se confirmó la actividad fitotóxica, a nivel de hojas de *T. erecta*, de las fracciones de *Alternaria tagetica*.

Los resultados permitieron continuar con la evaluación de las diferentes fracciones para determinar la respuesta, a nivel celular, en cultivos de *Tagetes erecta*.

2.5 BIBLIOGRAFÍA

Cotty, P., J. Misaghi and R. Hine (1983). *Production of zinniol by Alternaria tagetica and its phytotoxic affect on Tagetes erecta*. Phytopathology, 73, 1326-1328.

Cotty, P. and J. Misaghi (1984). *Zinniol production by Alternaria species*. Phytopathology, 74, 785-788.

Gamboa-Angulo, M., Alejos-González, F., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2000). *Novel dimeric metabolites from Alternaria tagetica*. Journal of Natural Products, 63, 1117-1120.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2001). *Tagetolone and tagetenolone: two phytotoxic polyketides from Alternaria tagetica*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1228-1232.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2002). *Natural zinniol derivates from Alternaria tagetica. Isolation, synthesis, and structure-activity correlation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1053-1058.

Hotchkiss, E. and L. Baxter Jr. (1983). *Pathogenicity of Alternaria tagetica on Tagetes*. Plant Disease, 67, 1288-1290.

Morales, L. (2003). *Cuantificación de zinniol, tyrosol y ácido p-hidroxibenzoico en cultivos de Alternaria tagetica*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Ingeniería Química. 51 pp.

Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Kausst, H., P. Auriol and R. Ranjeva (1988). *Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 85, 5932-5935.

Tomioka, K., T. Sato and H. Koganezama (2000). *Marigold leaf spot caused by Alternaria tagetica new to Japan*. Journal of General Plant Pathology, 66, 294-298.

Capítulo 3

Establecimiento y caracterización de los cultivos celulares de *Tagetes erecta* L.

3.1 INTRODUCCIÓN

Para los estudios sobre la interacción planta-patógeno se requieren modelos experimentales que permitan evaluar los diferentes mecanismos de patogénesis y las respuestas a nivel celular que se desencadenan como consecuencia de esta interacción (Joosten, 1999; Asai et al., 2000). El principal modelo vegetal que se ha utilizado ha sido *Arabidopsis thaliana*, que al contar con una amplia gama de mutantes permite el esclarecimiento de diferentes procesos implicados en la defensa vegetal y de los mecanismos de infección de diferentes patógenos. Sin embargo, los procesos implicados en la interacción entre una especie vegetal y su patógeno son complejos, diferenciales y en muchos casos, altamente selectivos. Por esta razón, el establecimiento de un modelo experimental específico para la especie y su patógeno, implicado en la interacción es particularmente importante para coadyuvar en el esclarecimiento de los mecanismos de patogénesis y de defensa vegetal (Huang, 2001).

Hasta ahora los estudios realizados sobre la interacción *T. erecta*-*A. tagetica*, sólo involucran el uso de plantas completas y hojas de *T. erecta*, y no se conocen los mecanismos que se desencadenan a nivel celular durante la patogénesis (Cotty & Misaghi, 1983; Hotchkiss & Baxter, 1983; Gamboa-Angulo et al., 2002). En la actualidad, el conocimiento que existe sobre los metabolitos producidos por *A. tagetica*, representa una herramienta útil para estudiar el papel de los metabolitos fitotóxicos durante la interacción *T. erecta*-*A. tagetica*.

Existen diferentes reportes que describen la inducción de cultivos *in vitro* de diferentes especies del género *Tagetes* (Khotari & Chandra, 1984; Ketel, 1986 & 1987; Belarmino et al., 1992; Jacobs et al., 1995; Bepalhok & Hattori, 1998; Misra & Datta, 2001). Sin embargo, el único trabajo que describe el establecimiento de cultivos celulares de *T. erecta*, reporta que no fue posible mantenerlos de manera estable (Kothari & Chandra, 1986).

El objetivo de este capítulo es describir el proceso de obtención de un modelo experimental de cultivos celulares de *T. erecta*, para evaluar los mecanismos de patogénesis y la respuesta de esta especie a nivel celular durante su interacción con *A. tagetica*, así como caracterizar sus condiciones de cultivo y su ciclo de crecimiento *in vitro*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Semillas certificadas de *T. erecta* (*Marigold Xanthophyll Orangeade*, Seed-Ezf), se desinfectaron mediante un tratamiento de 10 minutos en etanol al 80% y 25 minutos en hipoclorito de sodio al 35%. Para su germinación, las semillas se colocaron en medio Murashige-Skoog (1962) modificado (MSB), e incubadas en cuarto de cultivo a 27 °C con iluminación continua. Las plántulas obtenidas se subcultivaron cada 28 días en medio de cultivo MSB fresco.

3.2.2 Preparación de medios de cultivo

El medio de cultivo MSB fue preparado de acuerdo a la descripción de Robert et al. (1987), sin adición de fitorreguladores y con 2.1 g·L⁻¹ de Gel Rite (Sigma) como soporte.

El medio de cultivo MS se preparó a partir de sales de macro- y micronutrientes, sacarosa y la mezcla de vitaminas, según Murashige & Skoog (1962), con la adición de la auxina ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, 2.26 µM) y cinetina (0.046 µM). El pH se ajustó a 5.7 y el medio se esterilizó en autoclave durante 15 minutos a 121 °C.

3.2.3 Inducción de callos y cultivos celulares

Se tomaron explantes de la segunda hoja de plántulas de dos semanas de *T. erecta*. Se cortaron las puntas de las hojas y se colocaron en medio de cultivo MS, adicionado con fitorreguladores (2.26 µM 2,4-D y 0.046 µM cinetina), y se incubaron a 25 °C en condiciones de oscuridad. Después de dos semanas se observó la formación de callos que fueron subcultivados cada tres semanas a medio de cultivo MS con fitorreguladores hasta obtener un callo friable. Una vez que se seleccionó el callo friable, se tomaron aproximadamente 2 g y se agregaron a medio de cultivo MS líquido, conteniendo las mismas concentraciones de fitorreguladores que en el medio para callos. Los matraces se colocaron en agitación continua (100 rpm) a 25 °C en condiciones de oscuridad, hasta obtener el cultivo de las células en suspensión, el cual se subcultivó por dilución 1:5 con medio de cultivo fresco cada 14 días.

3.2.4 Caracterización de cultivos celulares

La caracterización de la línea celular se llevó a cabo evaluando cada dos días durante 22 días, su viabilidad, su peso fresco y seco, el número de células y la conductividad y pH del medio de cultivo (Dodds & Roberts, 1985).

3.2.4.1 Viabilidad celular

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de azul de Evans (Escobedo & Miranda, 2003). A 1 mL de células en suspensión, se le agregaron 250 μ L del colorante azul de Evans al 0.1%. Las células se lavaron hasta eliminar el exceso de colorante, se resuspendieron en 2 mL de metanol al 50% con SDS al 1% y se incubaron a 65 °C durante 30 minutos (3X). El sobrenadante se llevó a un volumen final de 7 mL y se leyó la absorbancia a 600 nm. El control negativo se realizó con células en suspensión muertas (72 °C durante 30 minutos) (Escobedo & Miranda-Ham, 2003).

3.2.4.2 Determinación del crecimiento celular

El crecimiento celular en los cultivos en suspensión se determinó al cuantificar cada 2 días el peso fresco, el peso seco y el número de células. Las células fueron separadas del medio de cultivo por filtración, pesadas, secadas por liofilización y pesadas nuevamente, hasta obtener una masa constante. El conteo celular se realizó por microscopia óptica utilizando una cámara de conteo celular (Sedgewick) y células individualizadas con trióxido de cromo (Street, 1977).

3.2.4.3 Determinación de cambios en la conductividad y pH del medio de cultivo

Los cambios en la conductividad y el pH del medio de cultivo se determinaron cada tres días durante el tiempo de cultivo. El medio de cultivo se separó del paquete celular por filtración y al filtrado resultante se le midió el pH (potenciómetro, Termo Orion, modelo 420) y la conductividad (conductímetro, Hi8733, HANNA instruments).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Inducción de callos y cultivos celulares de *T. erecta*.

Los callos de *T. erecta* se obtuvieron a partir de explantes de hoja; los que presentaron mejor respuesta fueron los que se indujeron a partir de hojas jóvenes y sus características fueron un color amarillo claro, friables y de buena proliferación celular. A partir de este callo de dos semanas, se seleccionaron 2 g de callo friable y se colocaron en medio de cultivo líquido MS, con las mismas concentraciones de fitorreguladores presentes en el medio para callos. Los matraces se colocaron en agitación continua, para obtener las células en suspensión.

Primero, se indujeron células en suspensión en un matraz con 40 mL de medio de cultivo, y 15 días después se aumentó el número a cinco matraces. Una vez establecidos los cultivos celulares, estos se filtraron para obtener un cultivo fino. A partir de la segunda resiembra, se preparó un stock de células en suspensión, del cual se tomaron 5 mL y se inocularon en matraces con 40 mL de medio de cultivo. La resiembra se realizó cada dos semanas (Fig. 3.1).

3.3.2 Caracterización de la línea celular de *Tagetes erecta*

Para la caracterización de la línea celular de *T. erecta* se evaluó la viabilidad celular, el peso fresco y el peso seco del paquete celular y la conductividad y el pH del medio de cultivo.

Los indicadores de viabilidad demostraron que este parámetro permanece relativamente constante durante los primeros 10 días y que a partir del día 12 disminuye, indicando un incremento en la muerte celular del cultivo (Fig. 3.2 A)

Al determinar el crecimiento celular, tomando en cuenta el peso fresco, el peso seco y el número de células en los cultivos celulares; la fase de crecimiento exponencial se inició a partir del día dos, después de un periodo de recuperación, y a partir del día 14 comenzó la fase estacionaria (Fig. 3.2 B, C y D).

Por otra parte, la evaluación de los cambios en el pH y la conductividad del medio de cultivo durante el crecimiento, mostró que el pH del medio aumentó con el tiempo, en tanto que la conductividad, presentó un máximo a los 12 días de cultivo que pudo estar relacionado con la disminución de los nutrimentos en el medio de cultivo (Figs. 3.2 E y F).

De acuerdo a los resultados obtenidos, los cambios más significativos en el cultivo celular se presentaron entre los días 12-14, por lo que se eligió el día 12 para realizar la resiembra.

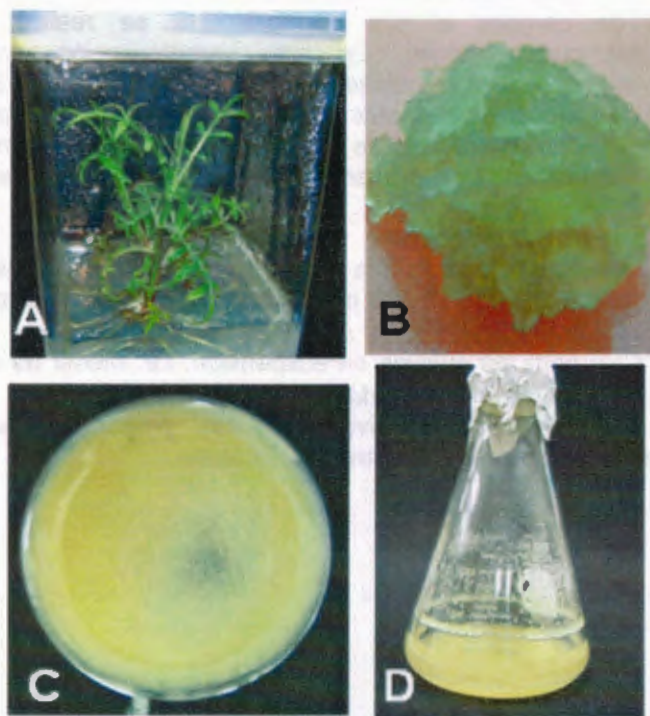


Figura 3.1. Cultivos *in vitro* de *T. erecta*. A: Plántulas de *T. erecta* cultivadas *in vitro*. B: Callos de *T. erecta*. C y D: Cultivos celulares en suspensión de *T. erecta*.

Después de cambiar el día de resiembra se realizó una segunda caracterización del cultivo celular. En esta caracterización, se observó un comportamiento muy semejante al indicado en la primera evaluación. Sin embargo, la viabilidad celular de los cultivos celulares aumentó ligeramente y presenta una curva de crecimiento clásica. Los resultados de peso fresco, peso seco, número de células, cambio de pH y conductividad en el medio fueron equivalentes a los ya reportados (Fig. 3.3).

Con base en los resultados de la caracterización celular, se establecieron las condiciones óptimas de cultivo para los callos de *T. erecta*, i.e. medio de cultivo MS con cinetina ($0.046 \mu\text{M}$), 2,4-D ($2.26 \mu\text{M}$) y $2.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de agente gelificante, en oscuridad a 25°C ; y para los cultivos en suspensión, i.e. medio de cultivo MS con cinetina ($0.046 \mu\text{M}$) y 2,4-D ($2.26 \mu\text{M}$), con agitación constante (100 rpm) en condiciones de oscuridad. Los cultivos celulares presentaron una coloración amarillenta y agregados celulares de entre 10-20 células.

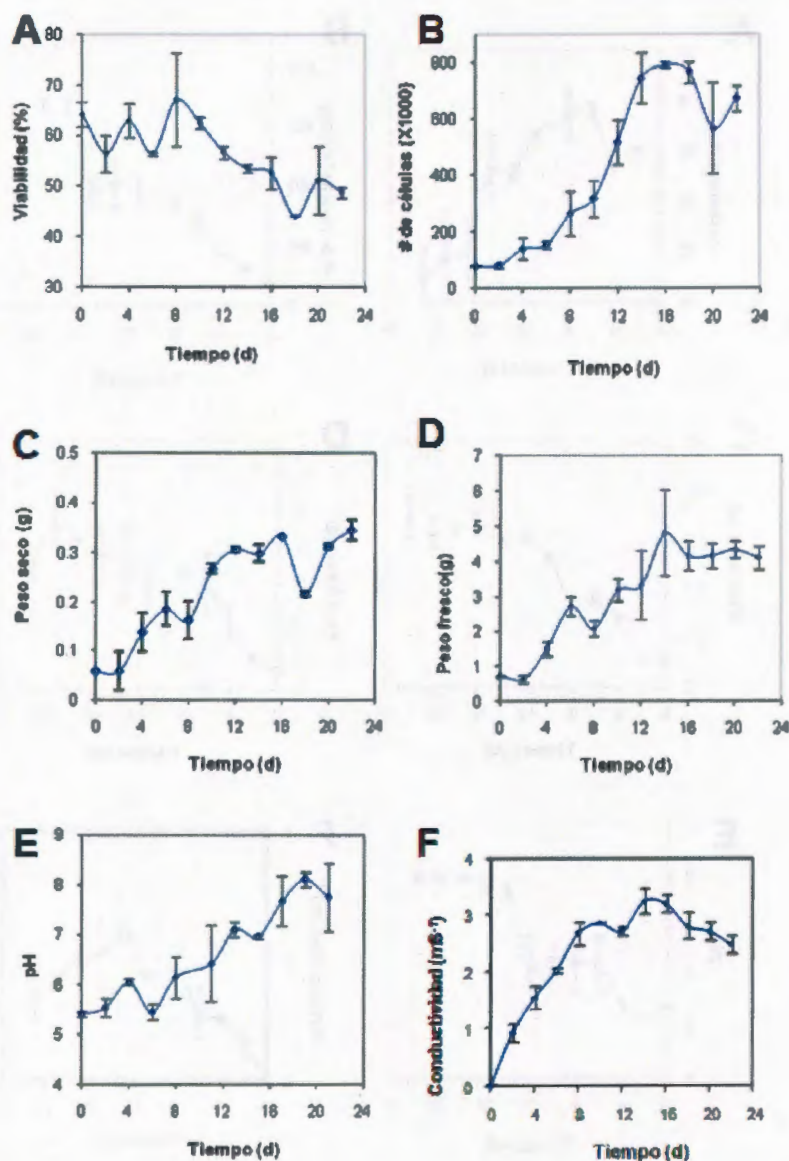


Figura 3.2. Primera caracterización de los cultivos celulares de *T. erecta*. A: Cambios en la viabilidad celular de cultivos celulares de *T. erecta*, B: Número de células en cultivos celulares, C: Determinación del peso seco de los cultivos celulares, D: Determinación del peso fresco de cultivos celulares, E: Cambios en el pH del medio de cultivo y F: Cambios en la conductividad del medio de cultivo. Los resultados son el promedio de 3 réplicas, $\pm$ SD.

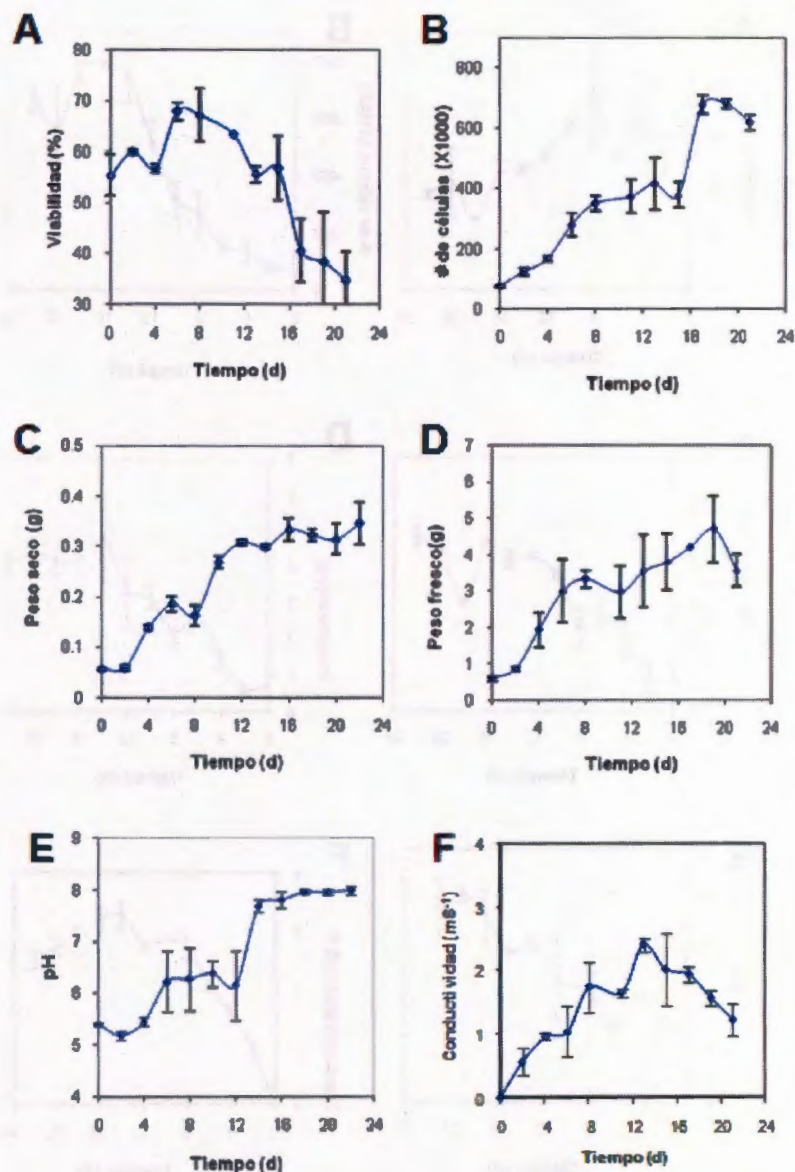


Figura 3.3. Segunda caracterización de los cultivos celulares de *T. erecta*. A: Cambios en la viabilidad celular de cultivos celulares de *T. erecta*, B: Número de células en cultivos celulares, C: Determinación del peso seco de los cultivos celulares, D: Determinación del peso fresco de cultivos celulares, E: Cambios en el pH del medio de cultivo y F: Cambios en la conductividad del medio de cultivo. Los resultados son el promedio de 3 réplicas, $\pm$ SD.

3.4 DISCUSIÓN

Este es el segundo reporte de una metodología exitosa para la generación de cultivos de células en suspensión de *T. erecta* (Kothari & Chandra, 1986).

El establecimiento de callos de *T. erecta* ha sido un evento ampliamente reportado. No obstante los reportes existentes sobre la inducción de cultivos de células en suspensión de *T. erecta* a partir de callos, estos indicaban que éstos no se habían logrado debido a su inestabilidad (Kothari & Chandra, 1986), o a la falta de callos friables (Ketel, 1987).

Los cultivos celulares de *T. erecta*, inducidos en este estudio, presentaron características particulares, como son un ciclo de cultivo de 12 días en el cual se observa un crecimiento celular abundante. A partir del día 14, se presentaron cambios drásticos en el crecimiento celular y, en general, en muchos de los parámetros evaluados para la caracterización del cultivo. Estos cambios podrían estar relacionados con la producción de metabolitos secundarios que se han descrito en cultivos celulares y callos de otras especies del género *Tagetes* (Jacobs et al., 1995; Ketel, 1996).

3.5 BIBLIOGRAFÍA

- Asai, T., Stone, J., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., J. Sheen and F. Ausubel (2000). *Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways*. The Plant Cell, 12, 1823–1835.
- Belarmino, M., T. Abe and T. Sasahara (1992). *Callus induction and plant regeneration in African marigold (Tagetes erecta L.)*. Japanese Journal of Breeding, 42, 835–841.
- Bespalhok, J. and K. Hattori (1998). *Friable embryogenic callus and somatic embryo formation from cotyledon explants of African marigold (Tagetes erecta L.)*. Plant Cell Reports, 17, 870-875.
- Cotty, P., I. Misaghi and R. Hine (1983). *Production of zinniol by Alternaria tagetica and its phytotoxic effect on Tagetes erecta*. Phytopathology 73, 1326-1328.
- Escobedo, R. and M. Miranda-Ham (2003). *Analysis of elicitor-induced cell viability changes in Lycopersicon esculentum Mill. suspension culture by different methods*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39, 236-239.
- Dodds, J. and L. Roberts (1985). *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Hotchkiss, E. and L. Baxter Jr. (1983). *Pathogenicity of Alternaria tagetica on Tagetes*. Plant Disease, 67, 1288-1290.
- Huang, J-S (2001). *Plant pathogenesis and resistance*. Kluwer Academic Publishers, Boston.
- Jacobs, J., Arroo, R., De Koning, E., Klunder, A., A. Croes and G. Wullems (1995). *Isolation and characterization of mutants of thiophene synthesis in Tagetes erecta*. Plant Physiology, 107, 807-814.
- Joosten, M. and P. De Wit (1999). *The tomato-Cladosporium fulvum interaction: A versatile experimental system to study plant-pathogen interactions*. Annual Review of Phytopathology, 37, 335-367.
- Ketel, H. (1986). *Morphological differentiation and occurrence of thiophenes in leaf callus from Tagetes erecta: relation to the growth medium of the plants*. Physiologia Plantarum, 93, 298–304.
- Ketel, H. 1987. *Callus and cell culture of Tagetes species in relation to production of thiophenes*. Wageningen Dissertation Abstracts. Wageningen University. Amsterdam, The Netherlands. pp: 130.

- Khotari, S. and N. Chandra (1984). *In vitro propagation of African marigold*. HortScience, 19, 703–705.
- Khotari, S. and N. Chandra (1986). *Plant regeneration in callus and suspension cultures of Tagetes erecta L. (African marigold)*. Journal of Plant Physiology, 122, 235–241.
- Misra, P. and S. Datta (2001). *Direct differentiation of shoot buds in leaf segments of white marigold (Tagetes erecta L.)*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 37: 466–470.
- Moehs, C., Tian, L., K. Osteryoung and D. DellaPenna (2001). *Analysis of carotenoid biosynthetic gene expression during marigold petal development*. Plant Molecular Biology, 45, 281–293.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*. Physiologia Plantarum, 15, 473–497.
- Nanir, S. and B. Kadu (1987). *Effect of some medicinal plants extract on some fungi*. Acta Botanica Indica, 15, 170–175.
- Raemakers, C., E. Jacobsen and R. Visser (1995). *Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding*. Euphytica, 81, 93–107.
- Robert, M., Herrera, J., F. Contreras and K. Scorer (1987). *In vitro propagation of Agave fourcroydes Lem. (Henequen)*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 8, 37–48.
- Russin, W., T. Uchytel and R. Durbin (1992). *Isolation of structurally intact secretory cavities from leaves of African marigold, Tagetes erecta L. (Asteraceae)*. Plant Science, 85, 115–119.
- Sarin, R. (2004). *Insecticidal activity of callus culture of Tagetes erecta*. Fitoterapia, 75, 62–64.
- Street, H. (1977). *Introduction in plant tissue and cell culture*. Blackwell Science Publisher, Oxford-New York.
- Wu, W-S., Chou, H-H., S-M. Lin and H-C. Wu (2001). *The effect of seed-borne pathogens on emergence of globe amaranth, calendula and Tagetes and the methods of control*. Journal of Phytopathology, 149, 91–96.

Capítulo 4

Establecimiento de las condiciones de evaluación

4.1 INTRODUCCIÓN

Al evaluar la actividad fitotóxica de metabolitos secundarios en diferentes modelos experimentales, es importante conocer y establecer las condiciones en las que serán evaluados. Lo anterior permite obtener resultados confiables y reproducibles, particularmente en el caso de la evaluación de la actividad fitotóxica de los metabolitos a nivel celular (Cotty et al., 1983; Cotty & Misaghi, 1984).

Entre los aspectos a considerar al realizar evaluaciones utilizando cultivos celulares, se encuentran el contar con un número apropiado de células y el conocer la edad óptima del cultivo para que los resultados obtenidos durante el tratamiento sean representativos. Asimismo, para el caso de las fracciones fitotóxicas es importante considerar la concentración umbral y el tiempo de exposición necesarios para observar una respuesta en los cultivos celulares.

El objetivo de este capítulo consistió en optimizar las condiciones de evaluación, definiendo factores como la densidad celular, la edad del cultivo, el tiempo de exposición y la concentración umbral, a la que se evaluaron las diferentes fracciones fitotóxicas.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material biológico

Se utilizaron cultivos celulares de *T. erecta*, previamente establecidos y caracterizados (Cap. 3).

4.2.2 Fracciones fitotóxicas

Las diferentes fracciones fitotóxicas se obtuvieron a partir de cultivos de *A. tagetica* siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Cap. 2). Las diferentes fracciones se designaron de la siguiente manera: metabolitos totales (**Fracción A**), metabolitos de naturaleza hidrofílica (**Fracción B**), metabolitos de naturaleza lipofílica (**Fracción C**) y zinniol (**Fracción D**) (Gamboa-Angulo et al., 2002; Morales, 2003).

4.2.3 Determinación del inóculo

Para obtener el número de células necesarias para el inóculo se realizaron conteos celulares, utilizando una cámara Sedgewick adicionada con 1 mL de células previamente separadas con trióxido de cromo (Street, 1977). El conteo de células se realizó con ayuda de un microscopio.

4.2.4 Preparación de los cultivos celulares

Los cultivos celulares fueron transferidos a medio de cultivo MS sin fitorreguladores, para obtener una densidad celular de 2.5×10^5 células·mL⁻¹ (Wang et al., 1996) en 50 mL de medio, y se dejaron en recuperación durante 12 h. Transcurrido este tiempo, se agregaron las fracciones fitotóxicas a las concentraciones a evaluar y los cultivos se dejaron en incubación a 25 °C durante 48 h en condiciones de oscuridad. Las células se cosecharon al término de la incubación y enseguida se procedió a evaluar la actividad fitotóxica de las diferentes fracciones.

4.2.5 Evaluación de actividad fitotóxica a nivel celular

La actividad fitotóxica a nivel celular se cuantificó evaluando el porcentaje de viabilidad por medio del ensayo de Azul de Evans, descrito previamente (Escobedo & Miranda-Ham, 2003). Como control se utilizó una fracción que mostró una muerte celular completa (100%), obtenida mediante el calentamiento de células a 75 °C durante 30 minutos. Los porcentajes de viabilidad se calcularon al comparar la viabilidad encontrada en las células tratadas con respecto a la viabilidad de las células muertas por calor.

4.3 RESULTADOS

4.3.1. Tamaño de inóculo del paquete celular

Se determinó que 1.7 g de paquete celular de los cultivos de *T. erecta* era una unidad experimental equivalente a aproximadamente $250,000 \text{ células} \cdot \text{mL}^{-1}$, este número se había reportado como óptimo en cultivos celulares de tomate (Wang et al., 1996).

4.3.2. Determinación de la concentración umbral de las fracciones fitotóxicas y tiempo óptimo de exposición para los tratamientos

Para evaluar la concentración umbral en la que fue posible observar un cambio en la viabilidad celular se utilizó la **Fracción A**. Los resultados obtenidos mostraron que la viabilidad celular no es afectada, a ninguna de las concentraciones evaluadas después de 24 horas de exposición. Sin embargo, después de una exposición a 48 h en la concentración más alta ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), se observó una disminución (35%) en la viabilidad celular (Fig. 4.1, 4.2).

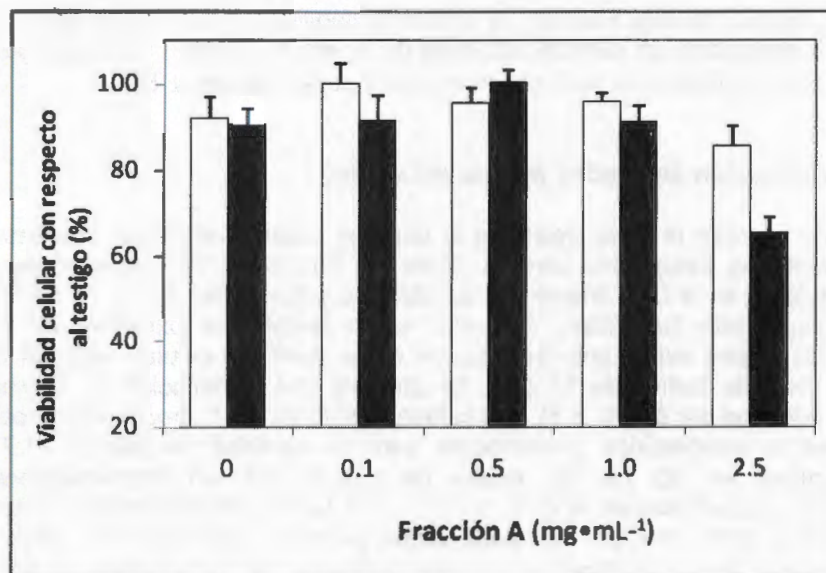


Figura 4.1. Determinación de la concentración umbral de la Fracción A. Se evaluó la viabilidad celular del cultivo de *T. erecta* a las 24h (□) y 48h (■) de exposición, a concentraciones de 2.5, 1.0, 0.5 y 0.1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Promedio de 3 experimentos independientes y tres réplicas, $\pm$ SD.

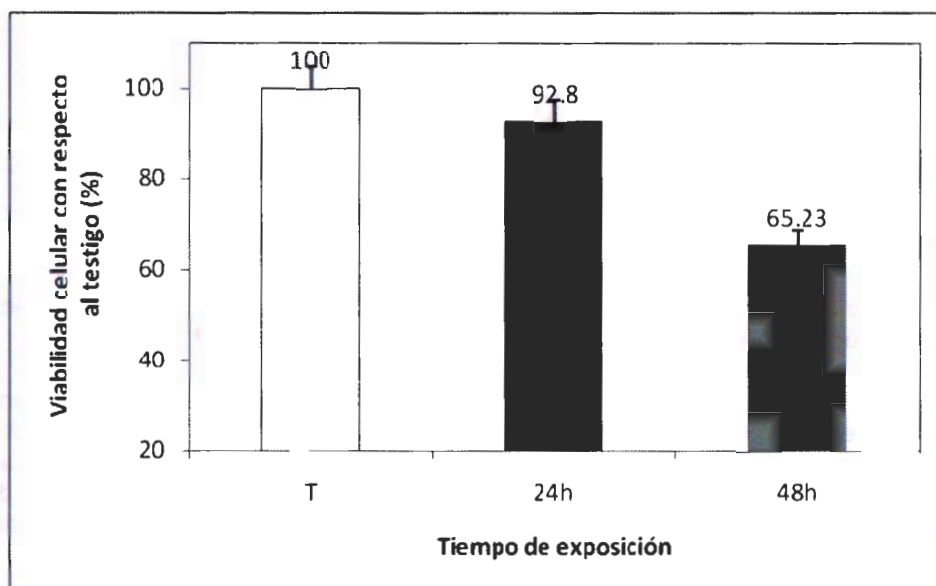


Figura 4.2. Actividad fitotóxica de la Fracción A. Con una concentración de $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de esta fracción, se evaluó la viabilidad celular a 24h (■) y 48h (■) de exposición en cultivos celulares de *T. erecta*. Testigo (T): agua destilada estéril (□). Promedio de 3 experimentos independientes, $\pm$ SD.

4.3.3. Determinación de la edad óptima del cultivo

Para conocer la edad óptima a la cual los cultivos celulares, presentan una mejor respuesta al tratamiento con las diferentes fracciones fitotóxicas se evaluaron cultivos celulares en la fase intermedia del ciclo de cultivo (días 5, 6 y 7). La elección de días consecutivos tuvo como fin, evitar en lo posible los extremos del ciclo de cultivo en los cuales existe una disminución de la viabilidad celular, además de que durante el ciclo de cultivo de 12 días, se observa una disminución de la viabilidad celular después del día 8 (Fig. 3.3). Los cultivos celulares de *T. erecta* se sometieron a los parámetros establecidos previamente para la cantidad de inóculo (1.7 g de paquete celular en 50 mL de medio de cultivo MS sin fitorreguladores), la concentración de la **Fracción A** ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) y el tiempo de exposición (48 horas) y agua destilada como testigo. Tomando como principal parámetro de selección la viabilidad celular de los testigos y una mayor respuesta del cultivo después de que se incubaron con la fracción fitotóxica. Los resultados mostraron que tanto el día 5, como el día 6 tuvieron valores de viabilidad semejantes en los testigos y en las células tratadas, mientras que el día 7 presentaron una menor diferencia entre la viabilidad del testigo y el tratamiento. Sin embargo, se seleccionó el día 5 como la edad del cultivo más conveniente para realizar las evaluaciones, ya que a esa edad se observó la mayor diferencia entre la viabilidad del testigo y del tratamiento (Fig. 4.3).

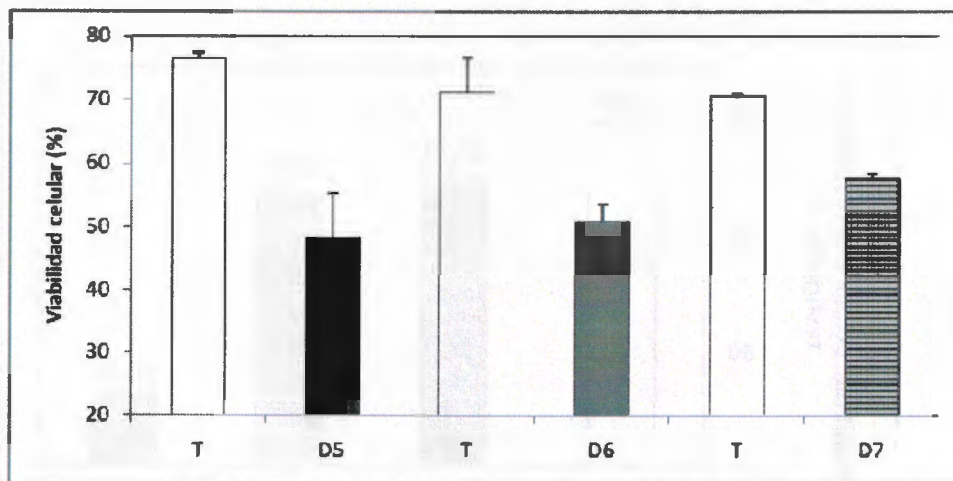


Figura 4.3. Viabilidad celular de cultivos de *T. erecta* de diferentes edades. Los cultivos fueron incubados con la **Fracción A** ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) por 48 h, en diferentes edades de cultivo. T (□): Testigo, agua destilada estéril; D5 (■): Cultivo celular de 5 días; D6 (■): Cultivo celular de 6 días y D7 (▨): Cultivo celular de 7 días. Se muestra el promedio de 3 experimentos independientes, $\pm$ SD.

Una vez establecidas las condiciones óptimas de evaluación para la **Fracción A**, éstas se utilizaron para evaluar el resto de las fracciones fitotóxicas. Para determinar la concentración umbral sobre los mecanismos de patogénesis en cultivos celulares de *T. erecta* con la **Fracción B** se realizó un experimento de dosis-respuesta con tres concentraciones, i.e. 0.625 , 1.250 y $2.500 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Al igual que la **Fracción A**, la **Fracción B** indujo una disminución de la viabilidad celular a la concentración más alta ($2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, Fig. 4.4).

Para el caso de la **Fracción C** (lipofílica), la mayor actividad fitotóxica se observó a una concentración de $2.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$, la cual causó una disminución de al menos el 50% de la viabilidad celular en los cultivos celulares de *T. erecta* (Fig. 4.5).

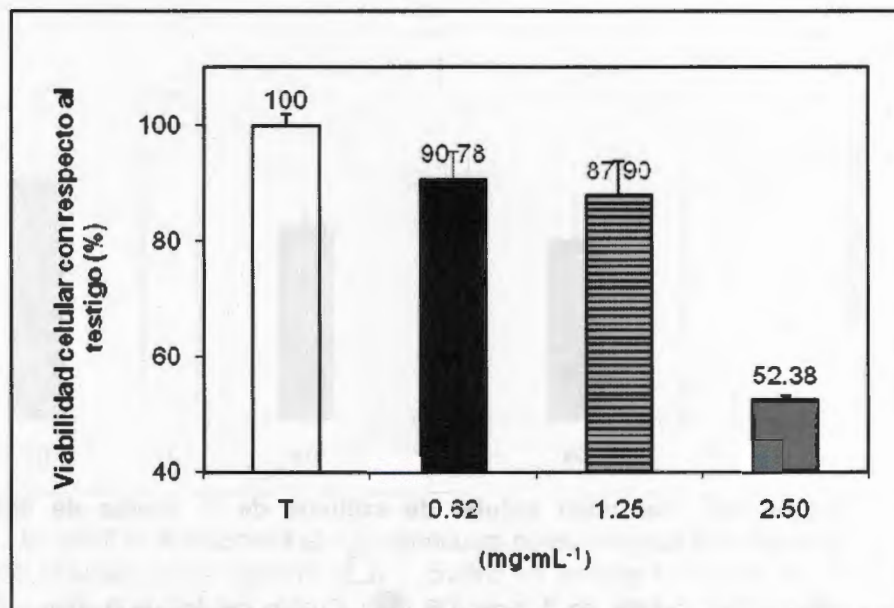


Figura 4.4 Determinación de la concentración umbral de la Fracción B. Se evaluó la viabilidad celular del cultivo de *T. erecta* después de ser expuestas por 48h a la acción de la **Fracción B**. Testigo (T): agua destilada estéril (□); Fracción B: 0.625 mg·mL⁻¹ (■); 1.25 mg·mL⁻¹ (▨) y 2.5 mg·mL⁻¹ (■). Promedio de 3 experimentos independientes, ± SD.

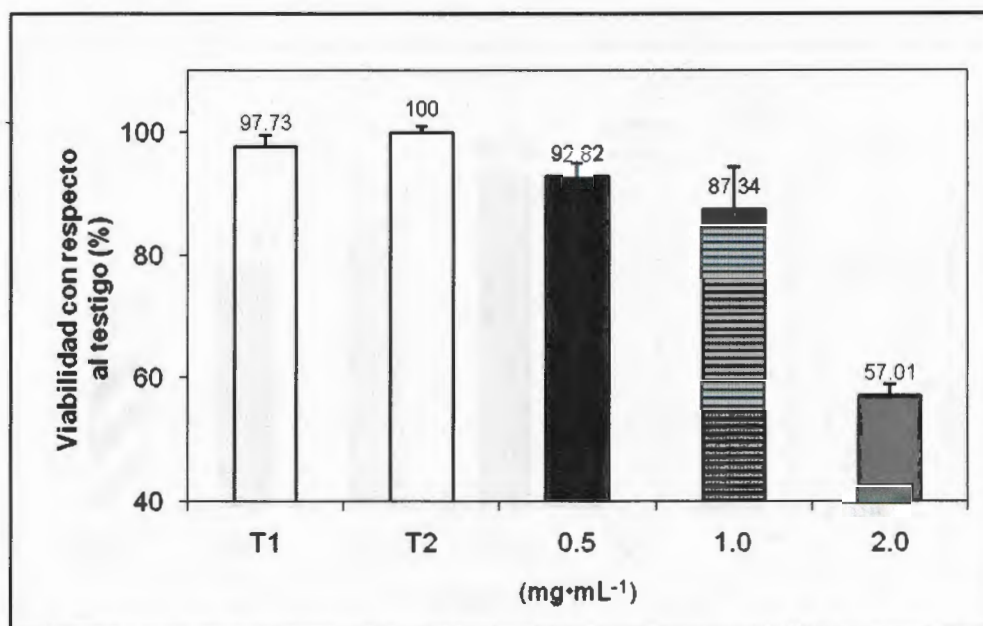


Figura 4.5 Determinación de la concentración umbral de la Fracción C. Se evaluó la viabilidad celular del cultivo de *T. erecta* después de ser expuesto por 48h a la acción de la **Fracción C**. T1: agua destilada estéril; T2: DMSO (□); Fracción C: 0.5 mg·mL⁻¹ (■); 1.0 mg·mL⁻¹ (▨) y 2.0 mg·mL⁻¹ (■). Promedio de 3 experimentos independientes, ± SD.

Para la preparación de la curva de dosis-respuesta de zinniol (**Fracción D**), una fitotoxina previamente reportada de cultivos de diferentes especies de *Alternaria*, se tomaron como referencia concentraciones comprendidas entre los 0.006 mg·mL⁻¹ (20 µM) y los 0.15 mg·mL⁻¹ (ca 500 µM), previamente reportadas como causante de una respuesta a nivel de receptores de Ca²⁺ en la membrana celular de protoplastos de zanahoria (Thuleau et al., 1988) y de actividad fitotóxica en hojas de *T. erecta* (Cotty et al., 1983), respectivamente.

Al evaluar zinniol a concentraciones de 0.025 a 0.15 mg·mL⁻¹, la mayor disminución en la viabilidad celular (25.35%) se observó en las concentraciones más altas (0.1 y 0.15 mg·mL⁻¹, Fig. 4.6).

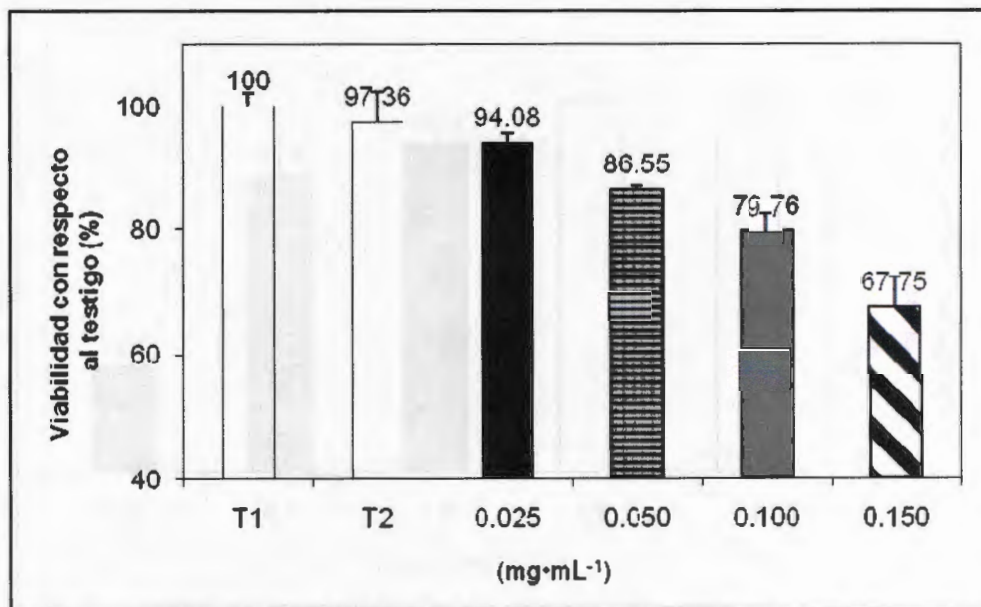


Figura 4.6 Determinación de la concentración umbral de la Fracción D. Se evaluó la viabilidad celular del cultivo de *T. erecta* 48h después de la exposición a la **Fracción D**. T1: Agua destilada estéril; T2: DMSO (□); **Fracción D**: 0.025 mg·mL⁻¹ (■); 0.050 mg·mL⁻¹ (▨); 0.100 mg·mL⁻¹ (■) y 0.150 mg·mL⁻¹ (▩). Promedio de 3 experimentos independientes, ± SD.

4.4 DISCUSIÓN

Se determinaron las concentraciones umbrales a las cuales los cultivos celulares de *T. erecta* presentan una respuesta en la viabilidad, al ser incubados con los metabolitos producidos por el fitopatógeno *A. tagetica*. Las concentraciones seleccionadas presentaron valores de actividad semejantes a nivel de la disminución de la viabilidad celular. Por lo tanto, se consideraron adecuadas para comparar sus respuestas a nivel celular.

En el caso del zinniol, no se presentó una disminución equivalente de la viabilidad celular a la obtenida con las otras fracciones. La **Fracción D** es un metabolito aislado previamente de los cultivos de *A. tagetica* por Cotty (1983) y Gamboa-Angulo (2000). Este metabolito fue reportado como una fitotoxina no-HST, producida por diferentes especies del género *Alternaria*, y está relacionado con la virulencia del patógeno en la planta (Cotty & Misaghi, 1984; Otani et al., 1995). Sin embargo, es interesante resaltar que se necesita de una concentración muy alta para reproducir una actividad fitotóxica en los cultivos celulares, y que de las concentraciones evaluadas, la que abate de manera importante la viabilidad celular es aquella que ha sido reportada como una que presenta actividad fitotóxica moderada a nivel de hojas de *Tagetes* (Cotty et al., 1983). Con base en los resultados obtenidos en la evaluación de la **Fracción D** (zinniol), se plantean nuevas preguntas: ¿Cuál es la contribución del zinniol a la actividad fitotóxica de la **Fracción C** en la que se encuentra?; ¿Es el zinniol el agente principal en la toxicidad de la **Fracción C**? Estas preguntas se trataron de responder con la evaluación del efecto del zinniol a nivel celular y su comparación con la respuesta obtenida en la **Fracción C**.

En las evaluaciones de viabilidad celular se presentó una disminución significativa del paquete celular, lo que podría estar indicando un efecto de las diferentes fracciones fitotóxicas sobre el crecimiento celular. Por lo que se decidió evaluar parámetros complementarios como la disminución del peso fresco y el número de células que se discuten en capítulos posteriores.

4.5 BIBLIOGRAFÍA

Cotty, P., J. Misaghi and R. Hine (1983). *Production of zinniol by Alternaria tagetica and its phytotoxic affect on Tagetes erecta*. Phytopathology, 73, 1326-1328.

Cotty, P. and J. Misaghi (1984). *Zinniol production by Alternaria species*. Phytopathology, 74, 785-788.

Escobedo, R. and M. Miranda-Ham (2003). *Analysis of elicitor-induced cell viability changes in Lycopersicon esculentum Mill. suspension culture by different methods*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39, 236-239.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2002). *Natural zinniol derivates from Alternaria tagetica. Isolation, synthesis, and structure-activity correlation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1053-1058.

Morales, L. (2003). *Cuantificación de zinniol, tyrosol y ácido p-hidroxibenzoico en cultivos de Alternaria tagetica. Tesis de Licenciatura*. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Ingeniería Química. 51 pp.

Otani, H., M. Kodama and K. Kohomoto (1995). *Alternaria toxins and their effects on host plants*. Canadian Journal of Botany, 73 (suppl. 1), S453-S458.

Street, H. (1977). *Introduction in plant tissue and cell culture*. Blackwell Science Publisher, Oxford-New York.

Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Kausst, H., P. Auriol and R. Ranjeva (1988). *Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 85, 5932-5935.

Wang, H., Li, J., R. Bostock and D. Gilchrist (1996). *Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development*. The Plant Cell, 8, 375-391.

Capítulo 5

Differential effects of phytotoxic metabolites from *Alternaria tagetica* on *Tagetes erecta* cell cultures¹

J. Qui, L.A. Castro-Concha, K. García-Sosa, L.M. Peña-Rodríguez and M.L. Miranda-Ham

5.1 ABSTRACT

Alternaria tagetica is a fungus that causes early blight in marigold. This pathogen synthesizes a broad range of metabolites having chemical structures of varying complexity that have shown phytotoxic activity when tested in leaves of *Tagetes erecta*. The objective of this study was to evaluate the effects, at the cellular level, of the different groups of metabolites produced by *A. tagetica*, when they interact with its host plant, and to determine if there was a differential response in the induction of key defense mechanisms such as damage to the cell membrane, ROS production and nuclear DNA fragmentation. The results showed that the different phytotoxic fractions have adverse effects on *Tagetes erecta* cell suspension cultures, and that these effects are related to some pathogenesis mechanisms attributed to phytotoxins. Exposure of cells to the metabolites released by *A. tagetica* into the culture media triggered a programmed cell death. However, when these metabolites were separated according to their chemical nature, i.e. hydrophilic and lipophilic, the death response found could be related to a toxic shock. This study presents a new perspective in the search for the role of phytotoxins, and for metabolites produced by phytopathogenic fungi in general, during the plant-pathogen interaction.

Keywords: *Alternaria tagetica*, DNA ladder, marigold, PCD, phytotoxic metabolites, *Tagetes erecta*.

¹Este capítulo ha sido sometido para su publicación en *Canadian Journal of Plant Pathology*

5.2 INTRODUCTION

Phytopathogenic fungi, when cultured *in vitro*, produce a broad range of secondary metabolites, having chemical structures of varying complexity (Van Kan, 2006). Some of these metabolites have been shown to possess phytotoxic activity when tested using a number of bioassays, including the leaf drop, immersion, and electrolyte leakage assays (Wood *et al.*, 1992; Otani *et al.*, 1995). The isolated bioactive metabolites have been used to study the phytotoxic mechanism using both *in vitro* and *in vivo* evaluations (Huang, 2001). However, most of these studies have attempted to evaluate the role of an individual metabolite in pathogenesis, and to designate it as a critical factor in the infective process, without taking into account its possible interactions with other phytotoxic or non-phytotoxic metabolites that are also produced by the pathogen, and without considering that the interaction between a pathogenic fungus and its host plant is a complex and diverse one (Wang *et al.*, 1996; Tiedemann, 1997; Navarre & Wolpert, 1999; Asai *et al.*, 2000; Huang, 2001; Tada *et al.*, 2001; Wolpert *et al.*, 2002). Still, it is generally accepted that in a plant-pathogen interaction, the induction of key defense mechanisms in plants occurs as a response to phytotoxic metabolites produced by the fungus. Many phytotoxic metabolites affect the integrity of cell membranes, either by having a specific protein as a target or, indirectly, via the enhanced production of reactive oxygen species, which induces lipoperoxidation of some membrane components (Wood *et al.*, 1992; Tiedemann, 1997; Heiser *et al.*, 1998). The overproduction of reactive oxygen species (ROS) is characteristic of the defense response to pathogens in plants, since ROS play an important role as signaling molecules or are involved directly in the expression of resistance. However, in interactions where necrotrophic organisms are involved, ROS have been associated with the establishment of the pathogen and with the subsequent development of the infection (Oliver & Solomon, 2004). One of the most notable effects of the mode of action of some phytotoxic metabolites is the induction of PCD in the site of infection. PCD is a genetically determined process that occurs in all multicellular organisms; it is characterized by a battery of morphological and biological changes such as nuclear condensation, cytoplasm shrinkage and cell death. There are two distinctive changes in DNA due to the onset of PCD in plants: one is related to the nucleus morphology, which is associated with a decrease in chromatin content, and the other is the development of a characteristic fragmentation pattern of chromatin in bands of 180 bp multiples, which are equivalent to the DNA segment protected by the nucleosome core (Greenberg *et al.*, 1994; Dangl *et al.*, 1996; Greenberg, 1997; Gilchrist, 1998). When cell death occurs as the result of a toxic shock, DNA damage appears as a smear in an agarose gel, resulting from unspecific cuts to the DNA.

Alternaria tagetica is a phytopathogenic fungus that causes early blight in marigold (*Tagetes erecta*); this pathogen synthesizes phytotoxic metabolites of both lipophilic and hydrophilic nature that, when tested using the leaf-drop assay on leaves of marigold plants, mimic the symptoms of the disease (Cotty *et al.*, 1983; Cotty & Misaghi, 1984; Gamboa-Angulo *et al.*, 2000, 2002; Morales, 2003). To date, no data has been obtained regarding the phytotoxic activity, at the cellular level, of the various

metabolites produced by *A. tagetica*. It is also presently unknown if the phytotoxic activity of the various metabolites and fractions, detected using the leaf-drop assay, is related to the induction of defense mechanisms such as the onset of the hypersensitive response, programmed cell death (PCD) or toxic shock, and to the successful establishment of the pathogen.

As part of a project directed to investigate the role of fungal metabolites in plant-pathogen interactions, the main objective of this study was to evaluate the effect, at the cellular level, of the various groups of metabolites produced by *Alternaria tagetica* when they interact with its host plant, and to determine if there exists a differential response in the induction of key defense mechanisms such as damage to the cell membrane, ROS production and nuclear DNA damage, by the various fractions.

5.3 MATERIALS AND METHODS

Preparation of phytotoxic fractions

A certified *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee. strain (ATCC 58771) was employed for the preparation of the different fractions. Parent cultures were maintained in V8-agar slant tubes at 4 °C. The primary inoculum was obtained from a spore suspension generated from a V8-agar plate, inoculated with a fragment of fungal mycelium from a parent culture slant tube and incubated at 26 °C for 15 days under natural light conditions. The spore suspension was used to inoculate one liter of CET medium [MgSO_4 , 500 mg; KH_2PO_4 , 1 g; casein hydrolysate, 6 g; sucrose, 100 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.15 mg; ZnSO_4 , 1 mg; NaMO_4 , 0.1 mg, in one liter of *Tagetes erecta* leaf infusion (20 g of leaves), adjusted to pH 4.9]. Flasks were kept under stationary conditions and natural light, at 26 °C for 28 days (Gamboa-Angulo *et al.*, 2002; Morales, 2003). When the incubation time was over, the mycelial mat was separated from the culture media by filtration. Half of the filtrate was lyophilized and resuspended in sterile water (25% w/v; Fraction A). The other half of the filtrate was extracted with ethyl acetate; the resulting aqueous phase was lyophilized and resuspended in sterile water (25% w/v; Fraction B), while the solvent in the organic phase was eliminated *in vacuo* and the residue was resuspended in dimethyl sulfoxide (20%, w/v; Fraction C).

Cell cultures

Certified seeds of *Tagetes erecta* L. (Marigold Xanthophyll Orangeade, Pan-American Seeds, Chicago, IL, USA) were germinated in modified Murashige-Skoog medium (MSB; Robert *et al.*, 1987) at 27 °C under continuous illumination. Plantlets were sectioned and leaf explants were placed in MSB medium, supplemented with 2.26 μM 2,4-D and 0.046 μM kinetin, and kept in the dark at 25°C. Friable calluses were obtained and sections of them were transferred to liquid MSB medium, with the same growth regulators used in the induction medium. Flasks were kept under continuous agitation (100 rpm) at 25 °C in the dark, and cells were subcultured by diluting (1:5) with fresh medium every 12 days.

Induction procedure

Five-day old cell cultures were transferred to liquid MS medium without growth regulators to a cell density of 250,000 cells/mL and allowed to recover for 12 h (Wang *et al.*, 1996). After this period of time, flasks were treated with different concentrations of the various phytotoxic fractions and incubated at 25 °C for 48 h.

Response analysis

Cell death detection

Cell viability was determined by the Evan's blue assay (Escobedo & Miranda-Ham, 2003). Other parameters, such as the number of cells and their fresh weight, together with changes in cell morphology (Street, 1977), were recorded after 48 h of exposure to the various phytotoxic fractions. Cells were separated from the liquid medium by filtration and their fresh weight was recorded, while the number of cells was quantified by directly counting in a Sedgewick chamber, after incubation with chromium trioxide.

H₂O₂ measurement

The accumulation of H₂O₂ was monitored in culture cell by the phenol red assay (Messner and Boll, 1994).

Electrolyte leakage assay

Conductivity measurements in the cell-free culture medium were done using a conductivity meter (Hi8733, HANNA instruments) (Marré *et al.*, 1998).

Lipid peroxidation assay

Cells (0.5 g) were frozen with liquid nitrogen, resuspended in 20 µM Tris-HCl (pH 7.4) containing butylated hydroxytoluene (BHT), and centrifuged (10,000 x g) at 4 °C for 20 min. Aliquots (200 µL) were treated with 650 µL of N-methyl-2-phenylindole and 150 µL concentrated HCl, incubated at 45 °C for 60 min, and clarified by centrifugation (10,000 x g) for 10 min. The absorbance of the supernatant at 586 nm was determined and a malondialdehyde (MDA) equivalent concentration was calculated using a standard curve (Erdelmeier *et al.*, 1998).

DAPI staining

Cells were pelleted (1000 x g) and washed with 10 mM phosphate buffer pH 7. The pellet was resuspended in 2 ml 4% paraformaldehyde in saline phosphate buffer solution and incubated for 24 h at 4 °C. The cells were then washed and resuspended in phosphate buffer. One milliliter aliquots were treated with 5 µL of a 0.1 mg/L DAPI solution and allowed to stand for 30 min. Cells were then observed under a fluorescence microscope (Invertoscopie Model Zeiss, 344-345 nm, 100-W mercury lamp). At least three independent experiments were performed with more than 500 nuclei observed per condition.

Evaluation of DNA fragmentation. Extraction of genomic DNA was carried out following Dr. Byeong-Ha Lee's protocol (bioProtocol™), with slight modifications (Chi-Manzanero *et al.*, 2000). DNA concentration in the samples was spectrophotometrically determined and equal amounts (10 µg) were analyzed in a 2% agarose gel electrophoresis (1 h, 80 V). DNA was visualized and evaluated, after staining with ethidium bromide, under UV light using a GelDoc 2000 (Bio-Rad), equipped with a Multanalyst software (Bio-Rad).

5.4 RESULTS

Evaluation of phytotoxicity at the cellular level

As previously reported, the total metabolites released by *A. tagetica* into the culture media (Fraction A) showed a phytotoxic activity that mimics the disease symptoms, when tested on marigold leaves using the leaf-drop assay. Furthermore, it was also shown that, as reported, when the metabolites were separated according to their hydrophilic or lipophilic nature (Fractions B and C, respectively), both fractions proved to be phytotoxic to marigold leaves. While activity of the lipophilic fraction has been credited mainly to zinniol and tyrosol (Gamboa-Angulo *et al.*, 2000, 2002), the identity of the phytotoxic-hydrophilic metabolites remains unknown.

In order to determine the threshold concentration to which each fraction was to be assayed, a dose-response experiment was performed using the cell viability index (measured using the Evan's blue assay), as an indicator of phytotoxicity. A threshold concentration of 2.5 mg/mL (fraction/medium) was determined for Fractions A (total phytotoxic metabolites) and B (hydrophilic metabolites), and of 2 mg/mL for fraction C (lipophilic metabolites). Distilled water and DMSO were used as controls in all experiments.

Phytotoxic activity was established by monitoring changes in cell viability, fresh weight and number of cells after treatment of cell cultures with each phytotoxic fraction (Figure 1). There were marked differences in these parameters between the control cells and those exposed to the various phytotoxic fractions. However, no significant differences in the viability, fresh weight or the number of cells could be observed among the cultures exposed to the different fractions.

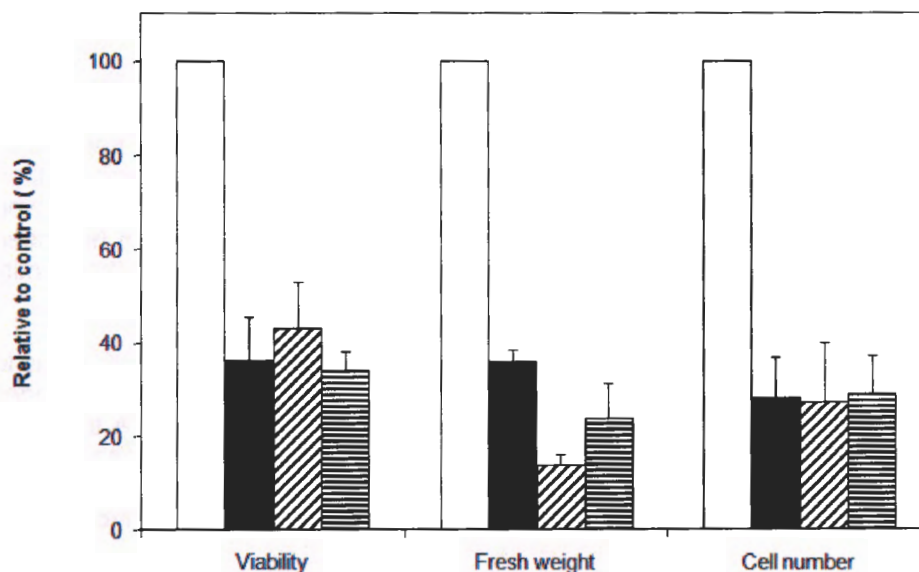


Figure 5.1. Phytotoxic activity, expressed as changes in viability, fresh weight and number of cells, of fractions A, B and C on *T. erecta* cell cultures after 48 hours. □: Control; ■: Fraction A; ▨: Fraction B; ▩: Fraction C. Values represent the mean of three independent experiments $\pm$ SE.

Microscopic observation of the cells showed clear morphological changes between the control and those from cultures treated with Fractions A, B and C (Figure 2). The most evident changes were a diminished cell volume and a high rate of plasmolysis in cells treated with the phytotoxic fractions, which explain the marked decrease in fresh weight (higher than 60%) (Figure 1). No phytotoxic effects were observed in cell cultures treated with lyophilized-uninoculated CET culture medium prepared at a similar concentration to that of Fraction A (2.5 mg/mL) (data not shown).

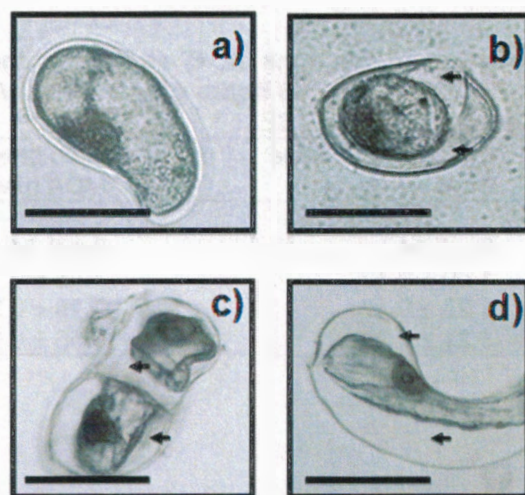


Figure 5.2. Effect of phytotoxic fractions A, B and C on cell morphology (20x). a) Control; b) Fraction A; c) Fraction B; d) Fraction C. Each experiment was performed at least three times with similar results. Arrows indicate plasmolysis presence. Scale bar = 50 μ m.

Damage to the cell membrane

The level of integrity of the membranes of cells exposed to different phytotoxic fractions was established by measuring the changes in the conductivity of the culture media. Although a differential response was observed between the conductivity values of the control and those in the media from cell cultures exposed to phytotoxic fractions A, B and C, no significant difference in the induced electrolyte leakage among the three phytotoxic fractions was observed (Table 1). The level of MDA, as an indicator of lipid peroxidation in the cell membranes (Esterbauer *et al.*, 1991), was highest in cells treated with Fraction A (total metabolites), followed by that observed in cultures treated with Fractions C (lipophilic metabolites) and B (hydrophilic metabolites) (Table 1).

Table 5.1. Effect of phytotoxic fractions A, B and C on the integrity of cell membranes of *T. erecta* cultures after 48 hours of treatment. Values represent the mean of three independent experiments $\pm$ SE.

	Electrolyte leakage Conductivity (mS)	Lipid peroxidation MDA (μ M)
Control	0 ± 0.14	0 ± 0.34
Fraction A	1.09 ± 0.12	4.45 ± 0.19
Fraction B	1.23 ± 0.17	2.18 ± 0.27
Fraction C	1.21 ± 0.22	3.56 ± 0.57

***H₂O₂* production**

The production of H₂O₂ in *T. erecta* cells exposed to the different phytotoxic fractions proceeded in a differential manner. While no significant differences among the various treatments could be discerned during the first six hours, from then on, changes in the accumulation of H₂O₂ were evident for both the control cells and those treated with the three phytotoxic fractions. In cells treated with Fraction **A** or Fraction **B**, the increase in H₂O₂ accumulation took place earlier (12 and 6 h, respectively) than in the control. In the case of cells treated with Fraction **C**, no changes in the H₂O₂ concentration were detected during the 72 hours of the experiment. It is worth noting the accumulation of H₂O₂ after 24 h in the control cells, probably due to a normal ageing process (Figure 3).

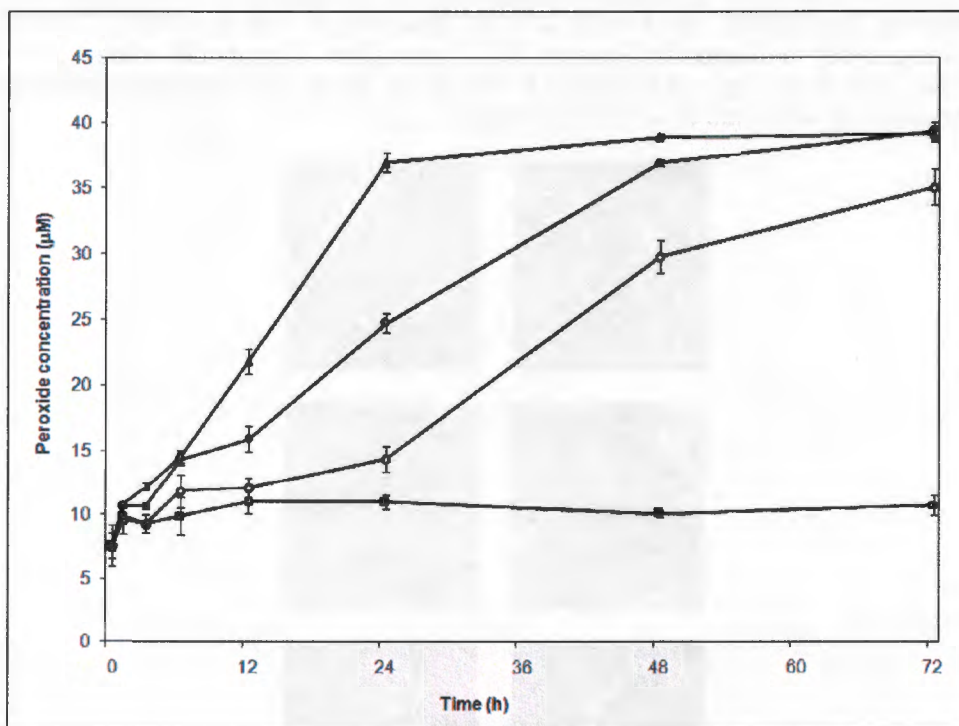


Figure 5.3. Production of H_2O_2 in *T. erecta* suspension cultures exposed to the phytotoxic fractions A, B and C. (O) control; (●) Fraction A; (△) Fraction B; (■) Fraction C. Values represent the mean of three independent experiments $\pm$ SE.

Damage to the DNA. Figure 4 shows the micrographs of nuclei from *T. erecta* cells treated with the different phytotoxic fractions, while Figure 5 shows the corresponding DNA fragmentation patterns. Treatment of *T. erecta* cells with the different phytotoxic fractions resulted in a differential response; in cells exposed to Fraction A, PCD appeared to have taken place, i.e. chromatin in the nucleus was in a condensed state (Figures 4c and 4d) and the DNA fragmentation pattern showed a clear banding ("DNA ladder") (Figure 5, lane 3). In the case of *T. erecta* cells exposed to Fraction B, condensation of chromatin, as well as a decrease in cell volume and the migration of the nucleus to the cell's periphery, were observed (Figures 4e and 4f); however, when DNA integrity was evaluated, only a slight smear was detected (Figure 5, lane 4). Finally, cells treated with Fraction C also showed a migration of the nuclei to the periphery of the cell, but to a lesser extent than that recorded for fractions A and B (Figures 4g and 4h); in this case, there were signs of a major degradation of DNA, which translated into a stronger smear than that observed for cells exposed to Fraction B (Figure 5, lane 5). This suggests that induction of PCD occurs only when *T. erecta*

cells are treated with a fraction containing all phytotoxic and non-phytotoxic metabolites (Fraction A), since PCD was not observed in cells exposed to fractions containing either the lipophilic (Fraction C) or hydrophilic (Fraction B) metabolites in separate form. In the case of Fractions B and C, the dying cells presented symptoms of a toxic shock, which led to a necrotic process.

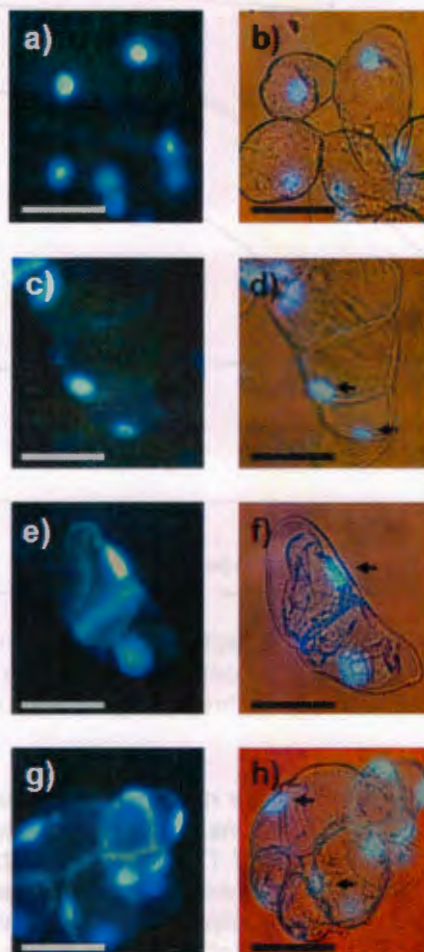


Figure 5.4. Nuclear DNA damage in *T. erecta* suspension cultures exposed to the different *A. tagetica* phytotoxic fractions. Nuclei were stained with DAPI and observed under a fluorescence microscope (left side) and phase contrast (right side) (25x). a) and b) control; c) and d) Fraction A; e) and f) Fraction B, g) and h) Fraction C. Arrows indicate representative condensed nuclei. Scale bar = 50 μ m.

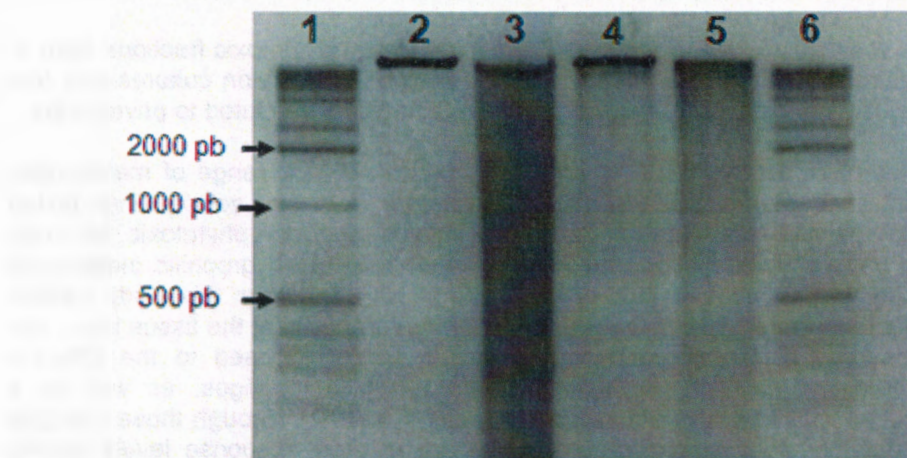


Figure 5.5. Genomic DNA fragmentation patterns in cells from *T. erecta* suspension cultures exposed to the different phytotoxic fractions A, B and C. Lanes 1 and 6: Molecular markers (1Kb); lane 2, control; lane 3, Fraction A; lane 4, Fraction B; lane 5, Fraction C.

5.5 DISCUSSION

The results here presented show that the different phytotoxic fractions from *A. tagetica* cultures have adverse effects on *T. erecta* cell suspension cultures and that these effects are related to some pathogenesis mechanisms attributed to phytotoxins.

It has been reported that *A. tagetica* produces a wide range of metabolites, both of lipophilic and hydrophilic nature, which present phytotoxic activity when tested on marigold leaves. While a number of phytotoxic and non-phytotoxic lipophilic metabolites have been identified, the chemical nature of the hydrophilic metabolites remains unknown (Gamboa-Angulo *et al.*, 2000; 2002). Data from this study confirm that the phytotoxic activity shown by the three different fractions at the tissue level, can also be observed at the cellular one (Figure 1). Cells exposed to the different phytotoxic fractions presented a series of morphological changes, as well as a decrease in cell volume and a marked plasmolysis (Figure 2). Though these changes cannot be ascribed to a single fraction, there are different response levels among them. Additionally, changes in the membrane integrity, detected as increments in conductivity in the culture medium, when tested by the electrolyte leakage assay, can be a consequence of cell death (Greenberg, 1997).

Another well-known pathogenesis mechanism is the induction of an accumulation of ROS, which has been related to the induction of plant defense responses to pathogen invasion, as well as to colonization by necrotrophic organisms (Oliver & Solomon, 2004; Van Kan, 2006). The specific role ROS play in the infectious process depends on the source of nutrients required by the pathogen. In the case of *Alternaria* spp. and other necrotrophic fungi, the pathogen produces several phytotoxins that induce, either directly or indirectly, an oxidative damage to the cell (Knogge, 1996; Heiser *et al.*, 1998; Paciolla *et al.*, 2004). In this case, *T. erecta* cell suspension cultures treated with the different *A. tagetica* phytotoxic fractions showed a differential response in their H_2O_2 production (Figure 3), suggesting that the accumulation of H_2O_2 during the interaction of *A. tagetica* and *T. erecta* can be related to the development of the infection. Additionally, the results obtained in this study suggest that Fractions A (total metabolites) and B (hydrophilic metabolites) contain metabolites that contribute to the development of the infective process, while the metabolites in Fraction C (lipophilic metabolites) appear not to play a role in this process.

It is interesting to point out that no direct relationship could be established between the accumulation of H_2O_2 and the lipid peroxidation data; e.g., in cells treated with Fraction C, though the levels of MDA were high, there was no accumulation of H_2O_2 . This could be attributed to the presence of other ROS, such as superoxide or hydroxyl radicals, that have been reported to be produced during plant-pathogen interactions (Heiser *et al.*, 1998).

The evaluation of damage to the genomic DNA is related directly to the induction of PCD mediated by specific phytotoxins (Wang *et al.*, 1996; Zhang *et al.*,

2004). In addition to isolated phytotoxins, PCD can also be induced, during plant-pathogen interactions, by metabolites identified as incompatibility factors; however, the resulting death process is related to the induction of plant resistance (Walton, 1996; Wolpert *et al.*, 2002). Cells exposed to Fraction A showed two of the the main characteristics related to PCD induction: chromatin condensation (Figures 4c and 4d) and the presence of a "DNA ladder" produced by an specific fragmentation of genomic DNA. These two landmarks have been considered key to differentiate PCD from death produce by toxic shock or necrosis (Greenberg *et al.*, 1994; Greenberg, 1997; Gilchrist, 1998; Govrin & Levine, 2000). When the metabolites present in Fraction A were separated according to their chemical nature, i.e. hydrophilic (Fraction B) and lipophilic (Fraction C), the death response found in the cells treated with either Fractions B or C could be related to a toxic shock, a process that leads to the observed non-coordinated DNA degradation.

It is important to mention that the adverse effects presented by the *T. erecta* suspension cultures when exposed to the different fractions of *A. tagetica*, could not be attributed to a single metabolite, or a group of metabolites with similar chemical nature, but rather to the complex mixture of metabolites produced by the fungus. This is in agreement with reports that suggest that the process of pathogenesis does not depend on the action of a single metabolite, but rather on the coordinated contribution of several components to potentiate cell responses resulting in the colonization of the plant by the pathogen (Wolpert *et al.*, 2002; Van Kan, 2006).

Data presented in this study open a new perspective in the search for the role of phytotoxins, and for metabolites produced by phytopathogenic fungi in general, during the plant-pathogen interactions. Although, in some cases, a mode of action has been described for phytotoxic metabolites produced by phytopathogenic fungi, in most cases this was not enough to determine their role in pathogenesis. An example of this is the search for the role of phytotoxins, specifically HST's, in pathogenesis: while they have been shown to induce PCD in cells in order to obtain nutrients for the necrotrophic pathogen (Wolpert *et al.*, 2002), there are some incompatibility factors that produce a similar response, where the death process is more related to the induction of resistance than to nutrient acquisition (Wolpert *et al.*, 2002). In the past, the role of many isolated metabolites in the pathogenesis mechanism has been considered of no importance, after testing them at the tissue level and without evaluating their effect at the cellular level. The results herein described suggest that this concept has to be revised. It is fundamental now to focus not only on the activity of a single metabolite, but also on the evaluation of the interactions among them.

ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by the National Science and Technology Council (CONACyT, Mexico) through grant No. 54868 and a doctoral scholarship for J.Q.-Z. (183263). We wish to thank Professor Anne E. Osbourne, John Innes Centre, Norwich UK, for her valuable comments on reviewing the manuscript, and PanAmerican Seed™ for providing *T. erecta* seeds.

5.6 REFERENCES

- Asai T., Stone J.M., Heard J.E., Kovtun Y., Yorgey P., Sheen J., Ausubel F.M. (2000) Fumonisin B1-induced cell death in *Arabidopsis* protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways. *The Plant Cell*, **12**, 1823–1835.
- Chi-Manzanero B., Robert M.L., Rivera-Madrid R. (2000) Extraction of total RNA from a high pigment content plant: Marigold (*Tagetes erecta*). *Molecular Biotechnology*, **16**, 17-21.
- Cotty P., Misaghi J., Hine R. (1983) Production of zinniol by *Alternaria tagetica* and its phytotoxic affect on *Tagetes erecta*. *Phytopathology*, **73**, 1326-1328.
- Cotty P., Misaghi J. (1984) Zinniol production by *Alternaria* species. *Phytopathology*, **74**, 785-788.
- Dangl J., Dietrich R., Richberg M. (1996) Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions. *The Plant Cell*, **8**, 1793-1807.
- Escobedo R.M., Miranda-Ham M.L. (2003) Analysis of elicitor-induced cell viability changes in *Lycopersicon esculentum* Mill. suspension culture by different methods. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, **39**, 236-239.
- Esterbauer H., Schaur R.J., Zollner H. (1991) Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radical Biology and Medicine*, **11**, 81-128.
- Erdelmeier I., Gerard-Monnier D., Yadan J., Chaudiere J. (1998) Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation. *Chemical Research in Toxicology*, **11**, 1184-1194.
- Gamboa-Angulo M., Alejos-González F., Escalante-Erosa F., García-Sosa K., Delgado-Lamas G., Peña-Rodríguez L. (2000) Novel dimeric metabolites from *Alternaria tagetica*. *Journal of Natural Products*, **63**, 1117-1120.
- Gamboa-Angulo M., García-Sosa K., Escalante-Erosa F., Alejos-González F., Delgado-Lamas G., Peña-Rodríguez L. (2002) Natural zinniol derivates from *Alternaria tagetica*. Isolation, synthesis, and structure-activity correlation. *Journal of Agriculture, Food and Chemistry*, **50**, 1053-1058.
- Gilchrist D. (1998) Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide. *Annual Review of Phytopathology*, **36**, 59-90.

- Govrin E.M., Levine A. (2000) The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, **10**, 751–757.
- Greenberg J.T. (1997) Programmed cell death in plant-pathogen interaction. *Annual Review of Plant Physiology and Molecular Biology*, **48**, 525-545.
- Greenberg J.T., Guo A., Klessig D.F., Ausubel F.M. (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell*, **77**, 551–563.
- Heiser I., Oßwald W., Elstner F. (1998) The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins. *Plant Physiology and Biochemistry*, **36**, 703-713.
- Huang J.S. ed. (2001) *Plant Pathogenesis and Resistance*. Dordrecht, Boston, London: Kluwer Academic Publishers, 1-130, 291-410.
- Knogge W. (1996) Fungal infection of plant. *The Plant Cell*, **8**, 1711-1722.
- Marré M., Amicucci E., Zingarelle L., Albergon F., Marré E. (1998) The respiration burst and electrolyte leakage induced by sulfhydryl blockers in *Egeria densa* leaves are associated with H₂O₂ production and are dependent on Ca²⁺ influx. *Plant Physiology*, **118**, 1379-1387.
- Messner B., Boll M. (1994) Cell suspension cultures of spruce (*Picea abies*): inactivation of extracellular enzymes by fungal elicitor-induced transient release of hydrogen peroxide (oxidative burst). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **39**, 69-78.
- Morales L. (2003) *Cuantificación de zinniol, tirosol y ácido p-hidroxibenzoico en cultivos de Alternaria tagetica*. Yucatán, México: Universidad Autónoma de Yucatán, Bachelor thesis.
- Navarre D.A., Wolpert T.J. (1999) Victorin induction of an apoptotic/senescence-like response in oats. *The Plant Cell*, **11**, 237–249.
- Oliver R.P., Solomon P.S. (2004) Does the oxidative stress used by plants for defense provide a source of nutrients for pathogenic fungi? *Trends of Plant Science*, **9**, 472-473.
- Otani H., Kodama M., Kohomoto K. (1995) *Alternaria* toxins and their effects on host plants. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 453-458.
- Paciolla C., Dipierro N., Mule G., Logrieco A., Dipierro S. (2004) The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration to the ascorbate metabolism in tomato protoplasts. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **65**, 49–56.

Robert M.L., Herrera J.L., Contreras F., Scorer K.N. (1987) *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **8**, 37–48.

Street H. ed. (1977) *Introduction in Plant Tissue and Cell Culture*. New York, USA: Blackwell Science Publisher, 1-10, 92-97.

Tada Y., Hata S., Takata Y., Nakayashiki H., Tosa Y., Mayama S. (2001) Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, **14**, 477–486.

Tiedemann A.V. (1997) Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **50**, 151–166.

Van Kan J. (2006) Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in Plant Science*, **11**, 247-253.

Walton J.D. (1996) Host-selective toxins: agents of compatibility. *The Plant Cell*, **8**, 1723–1733.

Wang H., Li J., Bostock V., Gilchrist D.G. (1996) Apoptosis: a functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. *The Plant Cell*, **8**, 375–391.

Wolpert T.J., Dunkle L.D., Ciuffetti L.M. (2002) Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? *Annual Review of Phytopathology*, **40**, 251–285.

Wood R., Ballio A., Graniti A. eds. (1992) *Phytotoxins in Plant Diseases*. London: Academic Press.

Zhang H.K., Zhang X., Mao B.Z., Li Q., He Z.H. (2004) Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice. *Cell Research*, **14**, 27-33.

Capítulo 6

Evaluación del zinniol en los mecanismos de patogénesis y defensa vegetal en cultivos celulares de *T. erecta*.

6.1 INTRODUCCIÓN

La mayoría de las evaluaciones a nivel celular y/o planta completa de metabolitos fitotóxicos con el fin de establecer su mecanismo y/o sitio de acción (Galum & Breiman, 1992; Navarre & Wolpert, 1999; Asai et al., 2000; Cessna et al., 2000; Colmenares et al., 2002; Zhang et al., 2004), utilizan un metabolito aislado y puro sin tomar en cuenta que, durante la interacción entre el fitopatógeno y su hospedero, el hongo produce una amplia variedad de metabolitos para favorecer el proceso infeccioso. Lo anterior podría explicar porqué, para el caso de algunas fitotoxinas, no se ha determinado el verdadero papel que estos metabolitos juegan en el proceso de patogénesis, aún cuando en algunos casos se ha establecido su sitio y/o mecanismo de acción (Walton, 1996; Wolpert et al., 2002). Desde esta perspectiva, y aún cuando existen una gran cantidad de reportes de metabolitos aislados de hongos fitopatógenos que han sido evaluados a nivel de planta completa y a nivel celular (Walton, 1996; Wang et al., 1996; Huang, 2001; Wolpert et al., 2002), hasta ahora no se ha reportado el efecto, a nivel celular, de los metabolitos de *A. tagetica*, sobre *T. erecta*.

El zinniol se reportó en 1983 (Cotty et al., 1983) como la principal no-HST presente en la fracción lipofílica obtenida a partir de los cultivos de *A. tagetica* en medio líquido lo cual se corroboró en el 2000 (Gamboa-Angulo et al., 2000). El zinniol es un policétido pentasustituido comúnmente producido por especies de *Alternaria*, incluyendo *A. zinniae*, *A. dauci*, *A. solani*, *A. macrospora*, *A. carthami*, y *A. porri*. Al zinniol se le reconoce como una no-HST que contribuye activamente en la virulencia de los fitopatógenos que lo producen (Cotty et al., 1983; Cotty & Misaghi, 1984).

En la interacción *A. tagetica*-*T. erecta*, la actividad fitotóxica de los filtrados, extractos orgánicos y productos puros se estableció mediante el bioensayo de gota en hojas (Gamboa-Angulo et al., 2000, 2001, 2002), considerando que la inducción de necrosis en las hojas de *T. erecta* esta relacionada con los síntomas de la enfermedad. Aún cuando existe un trabajo que describe el efecto del zinniol sobre protoplastos de zanahoria, en el cual se estableció la membrana celular como su posible sitio de acción (Thuleau et al., 1988), hasta ahora no existen reportes sobre el efecto del zinniol en cultivos vegetales de *T. erecta*, que permitan ilustrar el papel de este metabolito en el proceso de patogénesis del hongo.

En este capítulo se describen los resultados de las evaluaciones realizadas al incorporar zinniol cuando este se aplicó a los cultivos celulares de *T. erecta*. Los resultados se compararon con los observados para las otras fracciones fitotóxicas.

6.2 MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1 Material biológico

Se empleó una cepa certificada (ATCC 5877) de *Alternaria tagetica*, reaislada de hojas infectadas de *T. erecta*, manteniendo el cultivo "padre" en agar de jugo V8 (Gamboa-Angulo et al., 2002; Morales, 2003).

6.2.2 Material vegetal

Se utilizaron los cultivos celulares de *T. erecta* previamente establecidos y caracterizados, descritos en el capítulo 3.

6.2.3 Fracciones fitotóxicas

Las fracciones fitotóxicas utilizadas, se obtuvieron de acuerdo a la metodología detallada en el capítulo 2 (**Fracción A**: metabolitos fitotóxicos totales; **Fracción B**: metabolitos de naturaleza hidrofílica; **Fracción C**: metabolitos de naturaleza lipofílica; **Fracción D**: zinniol).

6.2.4 Preparación de los cultivos celulares

Los cultivos celulares de cinco días de edad se cambiaron a medio de cultivo MS sin fitorreguladores con un inóculo de 250,000 células·mL⁻¹ (Wang et al., 1996) en 50 mL de medio y dejados en recuperación por 12 h. Transcurrido el tiempo de recuperación, las fracciones correspondientes se inocularon a las concentraciones previamente evaluadas y se incubaron a 25 °C por 48 h. las células se cosecharon al término de la incubación y se procedió a evaluar los mecanismos de patogénesis.

6.2.5 Evaluación de actividad fitotóxica a nivel celular

La actividad fitotóxica se cuantificó al evaluar el nivel de muerte celular inducido por las fracciones mediante el ensayo de Azul de Evans descrito previamente (Escobedo & Miranda-Ham, 2003). Además, se evaluaron los cambios en el número de células y el peso fresco de los cultivos celulares después de ser expuestos a las fracciones fitotóxicas (Street, 1977).

6.2.6 Ensayo de fuga de electrolitos

El ensayo de fuga de electrolitos se llevó a cabo midiendo la conductividad (conductímetro Hi 8733, HANNA Instruments) del medio de cultivo libre de células. Las células se calentaron por 30 minutos a 80 °C para obtener el control de conductividad correspondiente a la fuga de electrolitos total (Marré et al., 1998).

6.2.8 Ensayo de peroxidación de lípidos de membrana

Las células se congelaron con nitrógeno líquido, se les suspendió en un amortiguador Tris-HCl (20 μ M, pH 7.4) con hidroxitolueno butilado (BHT) y se centrifugaron a 10,000 x g a 4 °C durante 20 minutos. Se tomaron alícuotas de 200 μ L, las cuales se combinaron con 650 μ L de N-metil-2-fenilindol y 150 μ L de ácido clorhídrico concentrado. Las células se incubaron a 45 °C durante 60 minutos y enseguida se centrifugaron a 10,000 x g durante 10 minutos. Se midió la absorbancia del sobrenadante a 586 nm y la concentración equivalente de malondialdehído (MDA) se obtuvo a partir de una curva estándar (Esterbauer et al., 1991; Erdelmeier et al., 1998).

6.2.9 Tinción con DAPI

Para la tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) se centrifugaron 10 mL de cultivos celulares a 1000 x g y el paquete celular se lavó con amortiguador de fosfatos (10 mM, pH 7). El paquete celular se agregó con 2 mL de paraformaldehído (4%, 1X PBS) y se incubó durante 24 horas a 4 °C. Posteriormente, las células se lavaron con amortiguador de fosfatos y se resuspendieron en el mismo amortiguador durante 12 h. Alícuotas de 1 mL se trataron con 5 μ L de una solución de DAPI (0.1 mg·mL⁻¹) y la suspensión se dejó en incubación durante 30 minutos. Transcurrido el tiempo se observaron las células usando un microscopio de fluorescencia (Inverstoscopio Zeiss, 344-345 nm).

6.2.10 Evaluación de la fragmentación del ADN

La extracción del ADN genómico se realizó siguiendo el método de Byeong-Ha Lee [University of Arizona (bioProtocol™)], modificado según describe Chí-Manzanero et al. (2000) para la obtención de ADN en tejidos vegetales pigmentados. El contenido de ADN de las diferentes muestras se determinó espectrofotométricamente y cantidades iguales (10 μ g) se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 2% (1 h a 80 V). El ADN se visualizó y se evaluó bajo luz UV, después de que se tñó con bromuro de etidio (0.1 μ g·mL⁻¹) mediante un fotodocumentador GelDoc 2000 (Bio-Rad Instruments), equipado con el software Multianalyst (Bio-Rad).

6.3 RESULTADOS

6.3.1. Actividad fitotóxica a nivel celular del zinniol

Para este estudio, la determinación de la concentración umbral se describió de manera detallada en el capítulo 4. Los resultados obtenidos en el capítulo 4 (Fig. 4.6) mostraron un nivel de fitotoxicidad mucho menor a lo esperado con las concentraciones evaluadas. Las concentraciones de 0.1 y 0.15 mg·mL⁻¹ causaron una disminución importante en la viabilidad (25 y 35%, respectivamente).

Con base a los resultados obtenidos, se seleccionó la concentración de 0.15 mg·mL⁻¹ de zinniol (**Fracción D**), para realizar la evaluación de su efecto en los mecanismos de patogénesis en cultivos celulares de *T. erecta*, aun cuando a esta concentración la disminución en la viabilidad no fue equivalente a la observada en las fracciones fitotóxicas (**Fracciones A, B y C**).

Los resultados de la evaluación de las **Fracciones A, B y C**, descritos en el capítulo 5, se compararon con los resultados obtenidos de la evaluación del zinniol. Al comparar los valores de viabilidad (Fig. 6.1), se observó un que el decremento menor del 35%, en los cultivos tratados con zinniol, comparado con disminuciones del 55-60% en los cultivos tratados con las **Fracciones A, B y C**.

Por otra parte, al evaluar el efecto de las diferentes fracciones sobre el peso fresco, se observó que el zinniol indujo una disminución del 50%, mientras que las otras fracciones causaron inhibiciones que comprendieron desde un 65% de la **Fracción A**, hasta un 85% de la **Fracción B** y un 75% de la **Fracción C** (Fig. 6.2).

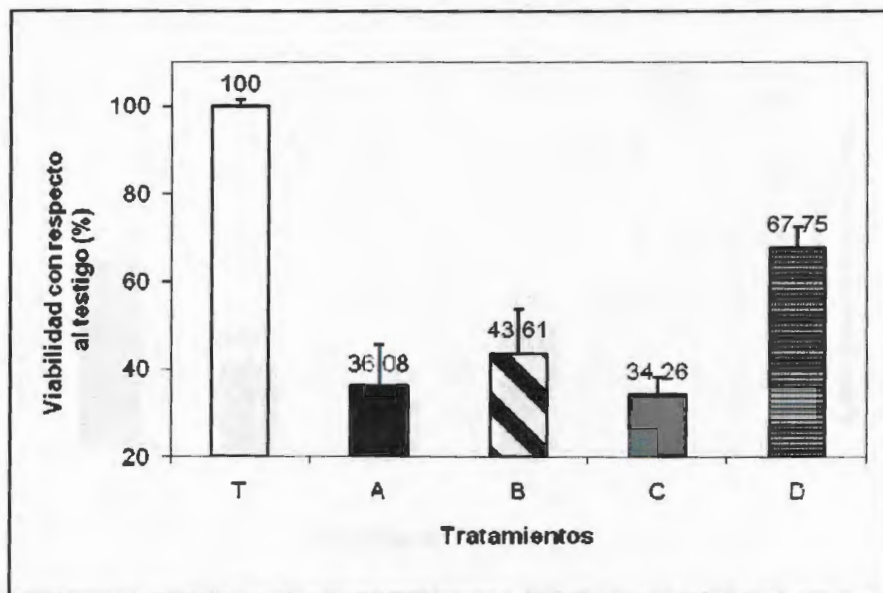


Figura 6.1 Disminución de la viabilidad celular de los cultivos celulares de *T. erecta*. Los cultivos celulares fueron incubados con las diferentes fracciones fitotóxicas de *A. tagetica* por 48 h. T: agua destilada estéril (□); A: **Fracción A**, $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (■); B: **Fracción B**, $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (▨); C: **Fracción C**, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (■) y D: **Fracción D** (zinniol), $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (▤). Promedio de 2 experimentos independientes, $\pm$ SD.

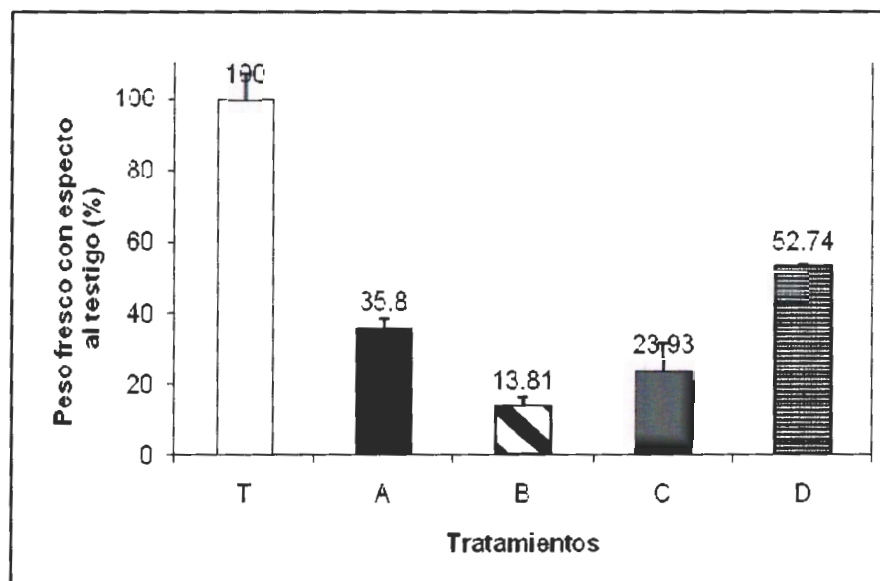


Figura 6.2 Disminución del peso fresco de los cultivos celulares de *T. erecta*. Los cultivos celulares fueron incubados con las diferentes fracciones fitotóxicas de *A. tagetica* por 48 h. T: agua destilada estéril (□); A: **Fracción A**, $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (■); B: **Fracción B**, $2.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (▨); C: **Fracción C**, $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (■) y D: **Fracción D** (zinniol), $0.15 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (▤). Promedio de 2 experimentos independientes, $\pm$ SD.

Los parámetros evaluados para determinar la actividad fitotóxica del zinniol a nivel celular mostraron un efecto menor al esperado al evaluar el efecto del zinniol sobre los cultivos celulares de *T. erecta*, a pesar de que la cantidad empleada de zinniol para el ensayo ya se reportó como suficiente para inducir necrosis en hojas de *T. erecta* (Cotty & Misaghi, 1984).

6.3.2 Evaluación del daño a la membrana celular

Para determinar los efectos del zinniol a nivel de la membrana celular se utilizaron los ensayos de fuga de electrolitos y la peroxidación de lípidos de la membrana celular (Wood et al., 1992; Tiedemann, 1997; Heiser et al., 1998; Deighton et al., 1999; Varith & Hyde, 2001).

El ensayo de fuga de electrolitos permitió evaluar la integridad de la membrana plasmática, al medir los cambios en la conductividad tomando como referencia cultivos en condiciones óptimas. En la Fig. 6.3 se observa que las

Fracciones A, B y C inducen respuestas similares (1.09-1.23 mS), en tanto que el efecto del zinniol (**Fracción D**) es un 50% (0.77 mS) menor con respecto al efecto causado por las **Fracciones A, B y C**. Al evaluar los cambios morfológicos causados por las diferentes fracciones fitotóxicas en los cultivos celulares (Fig. 6.4), se observó un efecto similar entre las **Fracciones A, B y C**; i.e. disminución del tamaño de la célula, mantenimiento de la integridad de la pared celular y migración del núcleo a la periferia de la célula. Aunque la migración del núcleo a la periferia de a célula también pudo observarse en células de cultivos tratados con zinniol, el resto de los efectos se observaron con menor intensidad.

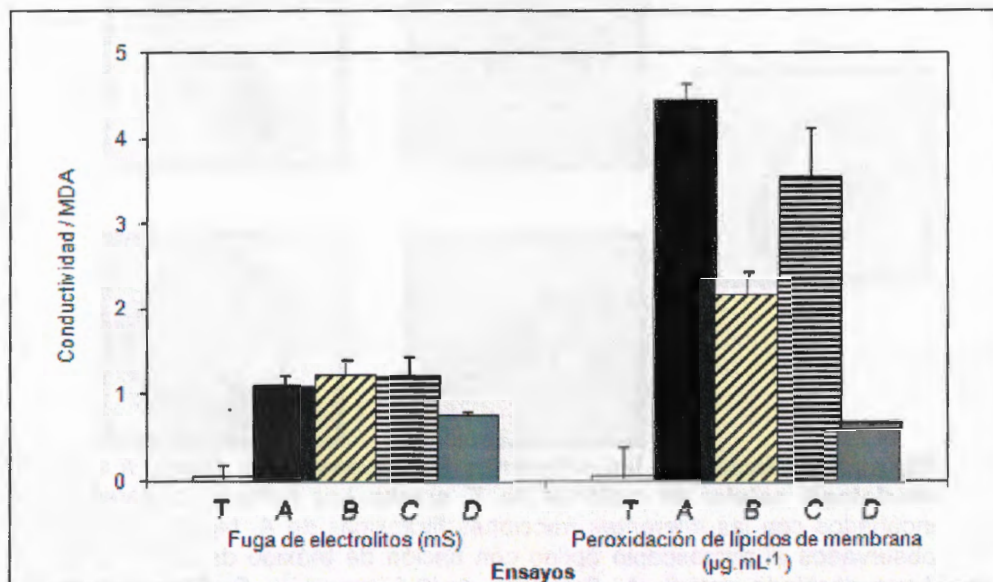


Figura 6.3 Daño en la membrana celular provocado por las diferentes fracciones fitotóxicas de *A. taquetica* en cultivos celulares de *T. erecta*. Los cultivos celulares fueron incubados con las diferentes fracciones fitotóxicas por 48 h. El daño a la membrana celular se relaciono con los cambios en la conductividad del medio de cultivo, por el ensayo de fuga de electrolitos y la presencia de peroxidación de los lípidos de la membrana, tomando como marcador los niveles de malondialdehído (MDA). T: DMSO (□); A: **Fracción A**, 2.50 mg.mL⁻¹ (■); B: **Fracción B**, 2.50 mg.mL⁻¹ (▨); C: **Fracción C**, 2.00 mg.mL⁻¹ (▩) y D: **Fracción D**, 0.15 mg.mL⁻¹ (■). Promedio de 2 experimentos independientes, ± SD.

En la evaluación de la peroxidación de lípidos de membrana, de los cultivos celulares (Fig. 6.3), las **Fracciones A y C** indujeron las máximas concentraciones de MDA ($4.45 \mu\text{M}$), en tanto que el efecto causado por la **Fracción B** correspondió a un valor cercano al 50% ($2.18 \mu\text{M}$) con respecto a la **Fracción A**, y el zinniol, mostró la menor concentración de MDA ($0.67 \mu\text{M}$), equivalente a un 18.8% del efecto causado por el total de los metabolitos de naturaleza lipofílica (**Fracción C**).

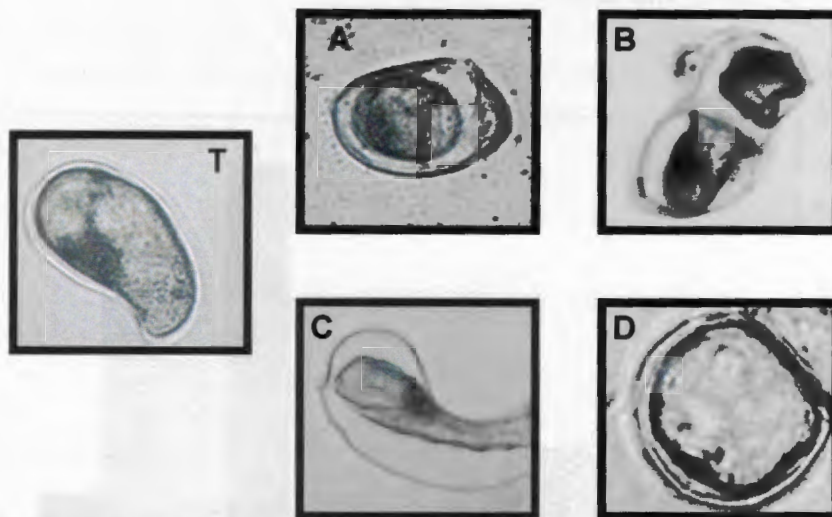


Figura 6.4 Efectos de las diferentes fracciones de *A. tagetica* sobre la morfología celular en cultivos de *T. erecta*. Los cultivos celulares fueron incubados con las diferentes fracciones fitotóxicas de *A. tagetica* por 48 h, y observados al microscopio óptico con tinción de trióxido de cromo (20X). T: Agua destilada estéril; A: **Fracción A** ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); B: **Fracción B** ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$); C: **Fracción C** ($2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) y D: **Fracción D** ($0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$).

6.3.3 Evaluación del daño al ADN

Para evaluar los cambios morfológicos del ADN nuclear en cultivos celulares de *T. erecta* como consecuencia del tratamiento durante 48 horas con las diferentes fracciones se utilizó una tinción con DAPI y las células se observaron con el microscopio de fluorescencia y en contraste de fases; para evaluar la fragmentación del ADN genómico, se extrajo el ADN de cultivos celulares después de ser tratados con las diferentes fracciones, y se visualizó en un gel de agarosa al 2%, teñido con bromuro de etidio.

Los cultivos celulares de *T. erecta* tratados con la Fracción A mostraron una condensación del ADN nuclear (Fig. 6.5 b y g) y su fragmentación (Fig. 6.6, carril 4), en tanto que los tratados con la Fracción B, mostraron una condensación de la

cromatina, una reducción en el tamaño de la célula y la migración del núcleo a la periferia de la célula, pero no una fragmentación del ADN, observándose únicamente un “barrido”. En los cultivos tratados con la Fracción C se observó una migración del núcleo celular a la periferia de la célula, así como una ligera condensación del mismo, aunque en menor proporción que el observado para los cultivos tratados con las fracciones A y B; al evaluar la integridad del ADN nuclear en estos cultivos, se observó un “barrido” de mayor intensidad que el causado por las fracciones A y B, sin tenerse una fragmentación en los segmentos característicos. Por último, los cultivos tratados con la Fracción D (zinniol) mostraron cambios morfológicos similares a los causados por la Fracción C, sin embargo, la fragmentación del ADN se observó en menor intensidad que con la Fracción C.

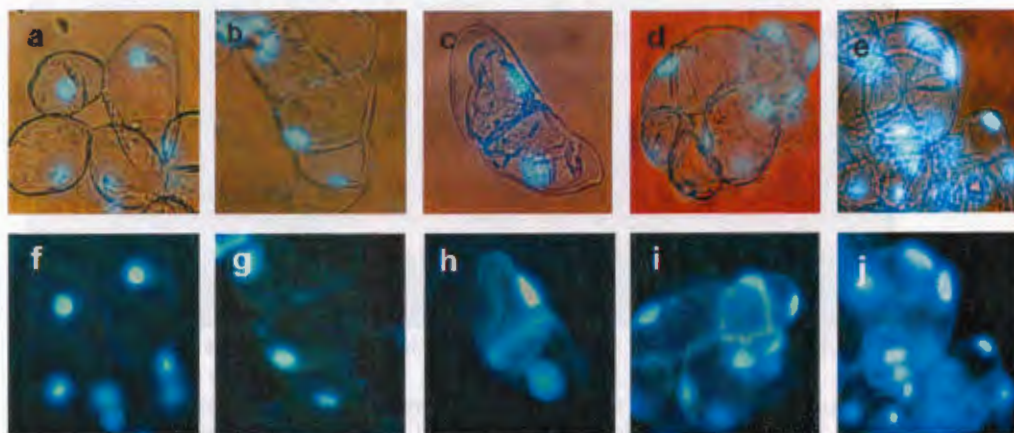


Figura 6.5 Efecto de las diferentes fracciones fitotóxicas de *A. tagetica* sobre el ADN nuclear en cultivos de *T. erecta*. Los cultivos celulares fueron incubados con las diferentes fracciones fitotóxicas por 48 h, teñidos con DAPI y observados en contraste de fase (25 X); a: Testigo, agua destilada estéril; b: Fracción A; c: Fracción B; d: Fracción C; e: Fracción D; Microscopía de fluorescencia, f: Testigo; g: Fracción A; h: Fracción B; i: Fracción C y j: Fracción D.

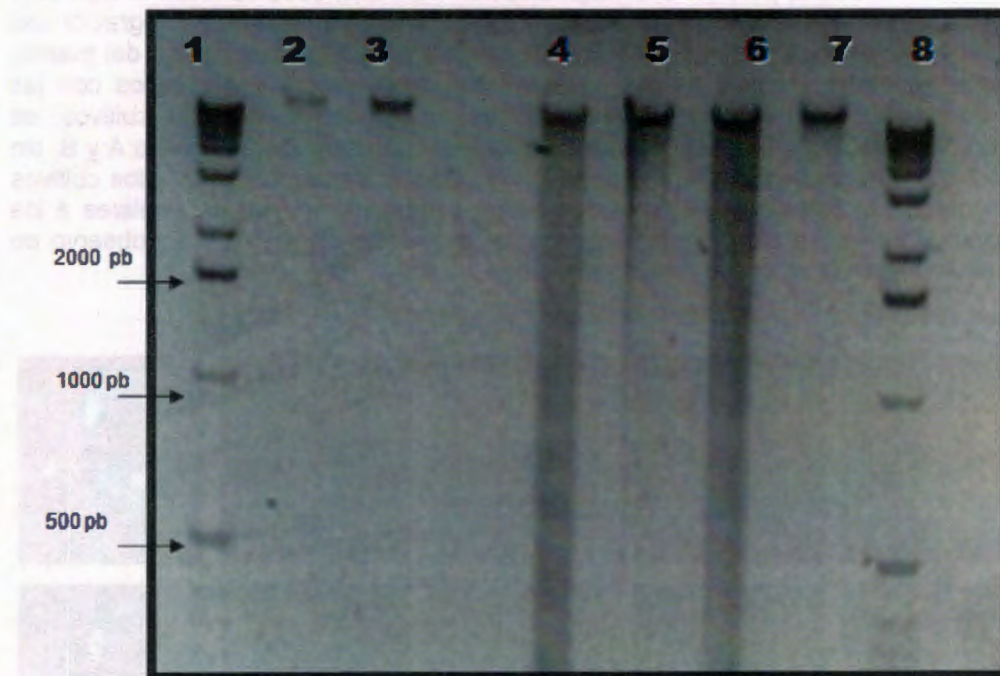


Figura 6.6 Efecto de las diferentes fracciones fitotóxicas de *A. tagetica* sobre la integridad del ADN genómico en cultivos de *T. erecta*. Los cultivos fueron incubados con las diferentes fracciones fitotóxicas por 48 h. Carriles 1 y 8: "Escalera" de ADN de 1 Kb; 2: Agua destilada estéril; 3: DMSO; 4: Fracción A; 5: Fracción B; 6: Fracción C y 7: Fracción D.

6.4 DISCUSIÓN

Se ha reportado que *A. tagetica* produce metabolitos con actividad fitotóxica y que estos pueden ser evaluados en el bioensayo de gota sobre hojas de *T. erecta*, y que el total de los metabolitos contenidos en el filtrado (**Fracción A**), pueden ser separados, mediante una extracción, en dos fracciones también fitotóxicas una hidrofílica (**Fracción B**) y una lipofílica (**Fracción C**) (Gamboa-Angulo et al., 2002). La actividad de la Fracción C principalmente esta relacionada a zinniol (**Fracción D**), pues este se ha identificado como el producto con mayor actividad fitotóxica después de ser evaluado en el bioensayo de gota en forma pura y como el metabolito fitotóxico mayoritario de la fracción lipofílica. Dada su abundancia este metabolito puede representar el 4% del total de los metabolitos, equivalente a una concentración de $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Cotty & Misaghi, 1984; Gamboa-Angulo et al., 2002). El zinniol es un policétido con un anillo aromático pentasustituido, descrito como una no-HST producido por diversas especies de *Alternaria*, incluyendo *A. tagetica* (Cotty & Misaghi, 1984). Se ha reportado que el zinniol presenta actividad fitotóxica en hojas de diferentes plantas, como son brócoli, algodón, cempasúchil, azafrán, rábano, zinnia, y algunas que no son hospederas del patógeno que las produce (Cotty & Misaghi, 1984). Aún cuando en hojas de *T. erecta* se ha reportado que el zinniol posee actividad fitotóxica a concentraciones de 0.1 y $0.2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, en este estudio, la actividad fitotóxica de zinniol en hojas de *T. erecta* se observó claramente a una concentración de $1.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Esta concentración es similar a la requerida por zinniol para causar una respuesta necrótica marcada en hojas de zanahoria (Fig. 2.2) (Barash et al., 1981).

Los resultados descritos en este capítulo mostraron que el zinniol no presentó una actividad fitotóxica marcada al ser evaluado en cultivos celulares de *T. erecta*; a la concentración de $0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (reportada como activa en el bioensayo de gota), el zinniol sólo abatió la viabilidad celular en un 32.5% en tanto que la **Fracción C** causo una disminución de casi el 65% (Fig. 6.1), de igual manera, y aún cuando el efecto del zinniol sobre la disminución en el peso fresco del paquete celular fue cercano al 50% (Fig. 6.2), este valor fue menor al de 76% causado por la **Fracción C**. Las concentraciones utilizadas para evaluar la actividad fitotóxica de zinniol en este estudio, fueron significativamente mayores a las empleadas para la evaluación de otras no-HSTs en modelos celulares. Los estudios en planta y a nivel celular de la toxina AAC de *Alternaria alternata* se han llevado a cabo utilizando concentraciones de 0.015 a $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, observándose la muerte de la planta y actividad a nivel del sitio de acción a concentraciones de hasta 0.001 - $0.0025 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Chen et al., 2005). Igualmente, la beauvericina y la toxina T-2, dos no-HSTs producidas por diferentes especies del género *Fusarium*, han mostrado una marcada actividad fitotóxica en protoplastos de tomate, a una concentración de $100 \mu\text{M}$ (Paciolla et al., 2005). La elevada concentración de zinniol ($0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$), necesaria para causar un efecto fitotóxico en células vegetales, fue reportada por Cotty (1984) como la necesaria para inducir un efecto en hojas de *T. erecta*. Sin embargo, cabe señalar que al tratar de correlacionar la producción del zinniol con la patogenicidad de varias especies de *Alternaria*, se encontró que la producción de zinniol en la mayoría de las especies

patogénicas no esta relacionada, de manera directa, con una mayor patogenicidad de la cepa productora.

Al igual que el efecto del zinniol sobre la viabilidad celular, el resto de las evaluaciones mostraron que los efectos causados por zinniol fueron menores a los causados por el total de los metabolitos lipofílicos (**Fracción C**) e.g. el daño al ADN y la peroxidación de lípidos de membrana (Fig. 6.3, 6.6 y 6.7). En lo que respecta al daño a la membrana celular, previamente identificada como el posible sitio de acción del zinniol, con una marcada estimulación del influjo de Ca^{2+} (Thuleau et al., 1988), en este estudio se obtuvieron valores de conductividad menores de los observados al evaluar la **Fracción C**.

Las bajas concentraciones a las cuales son evaluados, en modelos celulares, los metabolitos considerados fitotoxinas, y a las cuales presentan un efecto fitotóxico y/o inducen la muerte celular, son similares a los niveles producidos por el fitopatógeno durante su interacción *in vivo* con la planta hospedera. Si un metabolito, al ser evaluado a nivel celular, no presenta actividad fitotóxica a bajas concentraciones, eso podría indicar que el producto no está necesariamente implicado en el establecimiento y desarrollo de la enfermedad, y que la respuesta observada a nivel de hoja puede deberse a un efecto inductor de la respuesta de defensa. A menudo, lo anterior no se toma en cuenta al momento de designar un metabolito como una fitotoxina, tomándose como única referencia la actividad del metabolito en un modelo que utiliza hojas o segmentos de plantas, donde la necrosis observada no puede diferenciarse claramente si es producto de una reacción de defensa o de una actividad tóxica sobre la planta. Con base en lo anterior, es posible que el efecto necrotrófico causado por zinniol en las células vegetales del hospedero, no está necesariamente relacionado con el proceso de patogénesis, por lo que el zinniol podría considerarse mas como un inductor de la respuesta de defensa vegetal que una fitotoxina.

Para definir el verdadero papel de un metabolito en el proceso de patogénesis, es necesario utilizar modelos que permitan diferenciar una fitotoxina de un factor de incompatibilidad (Wolpert et al., 2002). uno de estos modelos requiere la detección del metabolito fitotóxico en tejido infectado y hasta ahora no se ha reportado la obtención de el zinniol a partir de tejidos infectados. Existe también la posibilidad de que el zinniol no sea el metabolito responsable de la virulencia de *A. tagetica*, y que esta se deba a otro de los metabolitos relacionados estructuralmente con zinniol, dado que *A. tagetica* produce una amplia gama de metabolitos con actividad fitotóxica (Gamboa-Angulo et al., 2000, 2001 & 2002; Arana-López et al. 2003). Aun cuando el zinniol es el producto mayoritario en los cultivos *in vitro* de *A. tagetica* y también el que presenta una mayor fitotoxicidad a nivel de hojas de *T. erecta*, hasta ahora no se ha evaluado el efecto, a nivel celular, de los otros metabolitos. Esta perspectiva debería de considerarse, teniendo en cuenta que en este trabajo se ha determinado que las diferentes fracciones evaluadas, sobre todo aquella que presenta la mayor complejidad (**Fracción A**), presentan una respuesta diferencial a nivel de los cultivos celulares.

6.5 BIBLIOGRAFÍA

Arana-López, G., Gamboa-Angulo, M., García-Sosa, K., F. Escalante-Erosa and L.M. Peña-Rodríguez (2003). *A chemical study of the mycelium of A. tagetica*. Revista de la Sociedad de Química de México, 47, 303-306.

Asai, T., Stone, J., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., J. Sheen and F. Ausubel (2000). *Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways*. The Plant Cell, 12, 1823-1835.

Barash, I., Mor, H., D. Netzer and Y. Kashman (1981). *Production of zinniol by Alternaria dauci and its phytotoxic effect on carrot*. Physiological Plant Pathology, 19, 7-16.

Cessna, S., Sears V., M. Dickman and P. Low (2000). *Oxalic acid, a pathogenicity factor for Sclerotinia sclerotiorum, suppresses the oxidative burst of the host plant*. The Plant Cell, 12, 2191-2199.

Chen, H., Mirocha, C., Xie, W., L. Hogge and D. Olson (1992). *Production of the mycotoxin fumonisin B1 by Alternaria alternate f. sp. lycopersici*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 3928-3931.

Chi-Manzanero, B., M. Robert and R. Rivera-Madrid (2000). *Extraction of total RNA from a high pigment content plant: Marigold (Tagetes erecta)*. Molecular Biotechnology, 16, 17-21.

Colmenares, A., Aleu, J., Duran-Patron, R, I. Collado and R. Hernandez-Galán (2002). *The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of Botrytis cinerea*. Journal of Chemical Ecology, 28, 997-1005.

Cotty, P., J. Misaghi and R. Hine (1983). *Production of zinniol by Alternaria tagetica and its phytotoxic affect on Tagetes erecta*. Phytopathology, 73, 1326-1328.

Cotty, P. and J. Misaghi (1984). *Zinniol production by Alternaria species*. Phytopathology, 74, 785-788.

Dangl, J., R. Dietrich and M. Richberg (1996). *Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions*. The Plant Cell, 8, 1793-1807.

Deighton, N., Muckenschnabel, I., B. Goodman and B. Willianson (1999). *Lipid peroxidation and the oxidative burst associated with infection of Capsicum annuum by Botrytis cinerea*. The Plant Journal, 20, 485-492.

Erdelmeier, I., Gerard-Monnier, D., J. Yadan and J. Chaudiere (1998). *Reactions of N-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. mechanistic aspects of the colorimetric assay of lipid peroxidation*. Chemical Research in Toxicology, 11, 1184-1194.

Escobedo, R. and M. Miranda-Ham (2003). *Analysis of elicitor-induced cell viability changes in Lycopersicon esculentum Mill. suspension culture by different methods*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 39, 236-239.

Esterbauer, H., R. Schaur and H. Zollner (1991). *Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes*. Free Radical Biology and Medicine, 11, 81-128.

Freeman, G. (1966). *Isolation of alternariol and alternariol monomethyl ether from Alternaria dauci (Kuhn) Groves and Skolko*. Phytochemistry, 5, 719-725.

Galum, E. and A. Breiman (1992). "Quantitative assays of phytotoxins using plant protoplasts and isolated cells", in: *Plant Toxins Analysis*. Linskens, H.F. and Jackson, J.F. (eds.). Springer-Verlag, New York, pp 33-50.

Gamboa-Angulo, M., Alejos-González, F., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2000). *Novel dimeric metabolites from Alternaria tagetica*. Journal of Natural Products, 63, 1117-1120.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2001). *Tagetolone and tagetenolone: two phytotoxic polyketides from Alternaria tagetica*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1228-1232.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2002). *Natural zinniol derivatives from Alternaria tagetica. Isolation, synthesis, and structure-activity correlation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1053-1058.

Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. Ben-Sasson (1992). *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. Journal of Cell Biology, 11, 493-501.

Gilchrist, D. (1998). *Programmed cell death in plant disease: the purpose and promise of cellular suicide*. Annual Review of Phytopathology, 36: 59-90.

Greenberg, J., Guo, A., Klessig, D. and F. Ausubel (1994). *Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions*. Cell, 77, 551-563.

Heiser, I., W. Oßwald and F. Elstner (1998). *The formation of reactive oxygen species by fungal and bacterial phytotoxins*. Plant Physiology and Biochemistry, 36, 703-713.

Hotchkiss, E. and L. Baxter Jr. (1983). *Pathogenicity of Alternaria tagetica on Tagetes*. Plant Disease, 67, 1288-1290.

Huang, J-S (2001). Plant pathogenesis and resistance. Kluwer academic publishers, Boston.

Marré, M., Amicucci, E., Zingarelle, L. F. Albergon and E. Marré (1998). *The respiration burst and electrolyte leakage induced by sulfhydryl blockers in Egeria densa leaves are associated with H₂O₂ production and are dependent on Ca²⁺ influx*. Plant Physiology, 118, 1379-1387.

Morales, L. (2003). Cuantificación de zinniol, tyrosol y ácido *p*-hidroxibenzoico en cultivos de *Alternaria tagetica*. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Yucatán. Facultad de Ingeniería Química. 51 pp.

Navarre, D. and T. Wolpert (1999). *Victorin induction of an apoptotic /senescence-like response in oats*. The Plant Cell, 11, 237-249.

Paciolla, C., Dipierro, N., Mule, G., A. Logrieco and S. Dipierro (2004). *The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration to the ascorbate metabolism in tomato protoplasts*. Physiological and Molecular Plant Pathology, 65, 49-56.

Rotem, J. (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, epidemiology, and pathogenicity. APS Press, Minnesota.

Starratt, N. (1968). *Zinniol: a major metabolite of Alternaria zinniae*. Canadian Journal of Chemistry, 46, 767- 770.

Sterlie, A., Upadhyay, J., Hershenhorn, G., G. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of Mycosphaerella fijiensis, the causative agent of Black Sigatoka disease of bananas and plantains*. Experientia, 47, 853-859.

Street, H. (1977). Introduction in plant tissue and cell culture. Blackwell Science Publisher, Oxford-New York.

Tada, Y., Hata, S., Takata, Y., Nakayashiki, H., Y. Tosa and S. Mayama (2001). *Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the defense response of oats to infection and elicitors*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14, 477-486.

Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Kausst, H., P. Auriol and R. Ranjeva (1988). *Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts*. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 85, 5932-5935.

Van Kan, J. (2006). *Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen*. Trends in Plant Science, 11, 247-253.

Varith, J. and G. Hyde (2001). *Quantification of damage severity and integrity of apple tissues using an electrolyte leakage technique*. Appendix: Post Harvest Biology and Technology (prepared for publication).

Walton, J. (1996). *Host-selective toxins: agents of compatibility*. The Plant Cell, 8, 1723–1733.

Wang, H., Li, J., R. Bostock and D. Gilchrist (1996). *Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development*. The Plant Cell, 8, 375-391.

Wolpert, T., L. Dunkle and L. Ciuffetti (2002). *Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name?* Annual Review of Phytopathology, 40, 251–285.

Wood, R., A. Ballio and A. Graniti (1992). *Phytotoxins in Plant Diseases*. Academic Press, London.

Yao, N., Tada, Y., Park, P., Nakayashiki, H., Y. Tosa and S. Mayama (2001). *Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats*. The Plant Journal, 28, 13-26.

Zhang, H., Zhang, X., Mao, B., Q. Li and Z. He (2004). *Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice*. Cell Research, 14, 27-33.

Capítulo 7

Discusión general

Una de las principales estrategias para aislar metabolitos fitotóxicos de hongos fitopatógenos es por la extracción y/o fraccionamiento del filtrado libre de micelio de cultivos *in vitro* del patógeno (Huang, 2001), al utilizar un bioensayo que permite el aislamiento biodirigido de metabolitos con actividad fitotóxica (Freeman, 1966; Staratt, 1968; Barash et al., 1981; Cotty et al., 1983; Sterlie et al., 1991; Otani et al., 1995; Gamboa-Angulo et al., 2002; Reino et al., 2004). Utilizando esta estrategia se ha logrado el aislamiento de la mayor parte de las más de 200 fitotoxinas HSTs o no-HSTs conocidas hasta ahora (Rudolph, 1976; Wood et al., 1992; Walton, 1996; Panagrahi, 1997; Collmer, 1998; Huang, 2001). Sin embargo, más del 50% de los metabolitos considerados actualmente como fitotoxinas no han sido debidamente caracterizados, debido a que sólo se considera su efecto fitotóxico a nivel macroscópico, utilizando ensayos en plantas completas o partes de ellas, con el fin de establecer su sitio y/o mecanismo de acción con base en los síntomas de la enfermedad (Durbin, 1981; Huang, 2001; Wolpert et al., 2002). En la mayoría de los casos, la actividad fitotóxica del metabolito no ha sido diferenciada entre un efecto fitotóxico real, o un efecto resultante de la inducción de los mecanismos de defensa por parte de la planta, en un intento de detener la aparente infección (Wolpert et al., 2002).

Aún así, este esquema de trabajo se ha utilizado extensivamente y es hasta ahora el que ha proporcionado la mayor parte de la información existente sobre las fitotoxinas producidas por hongos y bacterias fitopatógenas (Wood et al., 1992; Huang, 2001). Sin embargo, en algunos modelos, se han presentado problemas al momento de asignar el papel de una fitotoxina en el proceso de patogénesis utilizando los resultados obtenidos en bioensayos con plantas o partes de las mismas, como base. Este ha sido el caso de algunos metabolitos designados como HSTs, dado que las respuestas que inducen, al ser evaluados son muy similares a las inducidas por metabolitos considerados determinantes de avirulencia; sugiriendo que, mas que fitotoxinas, estos metabolitos corresponden a moléculas estrechamente vinculadas con el desarrollo de resistencia contra patógeno correspondiente en la planta (Wolpert et al., 2002).

Adicionalmente, si se tiene en cuenta que una de las principales respuestas provocadas por las HSTs a nivel celular es la inducción de una PCD en las plantas, y que el efecto macroscópico de esta respuesta es similar al inducido por metabolitos identificados como determinantes de incompatibilidad (Dangl et al., 1996; Birch et al., 2000; Govrin & Levine, 2000; Danji & Jones, 2001), es necesario realizar un estudio exhaustivo y profundo a nivel microscópico y molecular, que permita diferenciar

ambas respuestas e identifique si el efecto es producto de una interacción incompatible o compatible (Wolpert et al., 2002; Kiba et al., 2006).

Por otra parte, es importante tener en cuenta que los hongos fitopatógenos producen una amplia variedad de metabolitos secundarios, pertenecientes a diferentes familias químicas, y poseedores de diferentes tipos de actividad biológica a nivel de planta (Durbin, 1981; Ballio, 1991; Chen et al., 1992; Rotem, 1994; Panagrahi, 1997; Gamboa-Angulo et al., 2000, 2001 & 2002; Morales, 2003). Estos grupos de metabolitos, que en algunos casos se conservan en diferentes especies o géneros, pueden estar implicados de manera directa en el establecimiento de la patogenicidad (HSTs) o pueden contribuir con el desarrollo de la virulencia (no-HSTs) (Wolpert et al., 2002; van Kan, 2006), plantea las siguientes preguntas: ¿Es un sólo metabolito, de la amplia gama de metabolitos producidos por un hongo, el único responsable del establecimiento del patógeno en su planta hospedera?; ¿existe interacción entre los diferentes metabolitos producidos por un patógeno para la expresión de actividad?

Tomando en cuenta los cuestionamientos arriba mencionados, el objetivo principal del presente trabajo fue evaluar las respuestas de defensa vegetal y los mecanismos de patogénesis en la interacción entre *A. tagetica* y *T. erecta*, utilizando como herramienta diferentes fracciones de *A. tagetica*, con actividad fitotóxica comprobada en el bioensayo de gota utilizando hojas de *T. erecta* (Cotty et al., 1983; Hotchkiss & Baxter, 1983; Cotty & Misaghi, 1984, Gamboa-Angulo et al., 2000, 2001 & 2002; Arana-López et al., 2003; Morales, 2003). Aun cuando en la mayoría de las evaluaciones de metabolitos fitotóxicos en modelos celulares éstos se evalúan en forma pura, para este trabajo se planteó la relevancia de evaluar las respuestas inducidas cuando los metabolitos se encuentran formando parte de fracciones complejas, ya sea como parte del total de los metabolitos liberados por el hongo al medio de cultivo, o como parte de fracciones obtenidas por la separación de los metabolitos de acuerdo a su naturaleza química.

Como hipótesis del presente trabajo se planteó que, dada la composición química de las diferentes fracciones fitotóxicas obtenidas a partir de los filtrados de cultivo de *A. tagetica*, i.e. metabolitos totales (**Fracción A**), metabolitos hidrofílicos (**Fracción B**) y metabolitos lipofílicos (**Fracción C**), éstas deberían inducir respuestas diferenciales al ser evaluados su efectos en cultivos celulares de *T. erecta*.

Las evaluaciones realizadas en este trabajo están vinculadas con los mecanismos de patogénesis y de defensa vegetal, relacionados con la acción de fitotoxinas durante los procesos de interacción planta-patógeno (Durbi, 1981; Wang et al., 1996; Wolpert et al., 2002; van Varleen et al., 2004; Zhang et al., 2004). Los mecanismos de patogénesis incluyen las respuestas inducidas como consecuencia del daño que provoca un metabolito fitotóxico en las células y tejidos vegetales, desencadenando la muerte de la planta por un proceso relacionado con la fitotoxicidad (Scheffer, 1991; van Kan, 2006); en tanto que los mecanismos de defensa vegetal incluyen aquellos considerados como resultantes de la inducción de un mecanismo de

defensa (reacción de hipersensibilidad, HR) (Govrin & Levine, 2001; Able, 2003; Oliver & Solomon, 2004).

Los resultados obtenidos permitieron confirmar la hipótesis planteada, i.e. se observó que los diferentes grupos de metabolitos producidos por *A. tagetica* al ser evaluados en cultivos celulares de *T. erecta*, causan efectos adversos de una manera diferencial, y que estas diferencias se observan tanto en el grado, como en la velocidad de la respuesta. El tratamiento de los cultivos celulares con la fracción conteniendo los metabolitos totales liberados al medio de cultivo del hongo (**Fracción A**) indujo una respuesta equivalente a una PCD, observándose una condensación del ADN nuclear (Fig. 6.6) (Yao et al., 2001; van Baarlen et al., 2004) y la presencia de una "escalera de ADN" (Fig. 6.7) (Gavrieli et al. 1992; Ryerson & Heath, 1996; Tada et al., 2001). Estas dos características se consideran claves para diferenciar una PCD, de la muerte inducida por procesos tóxicos asociados con una necrosis (Greenberg et al., 1994; Greenberg, 1997; Gilchrist, 1998; Govrin & Levine, 2000).

Por otra parte, el tratamiento, por separado, de los cultivos celulares con la fracciones conteniendo los metabolitos hidrofílicos (**Fracción B**) o lipofílicos (**Fracción C**), indujo una muerte celular producto de un proceso tóxico, confirmada al observarse una degradación inespecífica del ADN genómico, como resultado de un proceso de muerte celular no coordinado, y visualizada como un "barrido", que podría implicar la participación de enzimas degradantes del ADN.

Aún cuando la inducción de una PCD ha sido relacionada en su mayoría, con un efecto causado por HSTs durante las interacciones planta-patógeno (Wang et al., 1996; Wolpert et al., 2002); este tipo de muerte celular también ha sido reportado como inducido por algunas fitotoxinas no-HSTs (Zhang, et al., 2004; van Kan, 2006) y por metabolitos identificados como factores de incompatibilidad (determinantes de avirulencia), como resultado de la inducción de resistencia de la planta al patógeno que los produce (Walton, 1996; Wolpert et al. 2002). Lo anterior sugiere que la inducción de una PCD no necesariamente está relacionada con el establecimiento exitoso de un patógeno. Sin embargo, los factores de incompatibilidad presentan un modelo interesante al momento de contrastar los efectos de las fitotoxinas en la planta, principalmente al momento de originar en la planta un papel determinante en la interacción planta-patógeno. Aún cuando la mayoría de los factores de incompatibilidad se pueden distinguir tanto a nivel estructural como mediante un análisis exhaustivo de las respuestas a nivel celular, este trabajo no siempre es posible con todos los metabolitos fitotóxicos aislados (Kiba et al., 2006). Los factores de incompatibilidad en su mayoría presentan características de proteínas, mientras que las fitotoxinas, salvo algunas excepciones, presentan características de metabolitos secundarios de bajo peso molecular. En cuanto a las respuestas que se presentan a nivel celular principalmente se distinguen el desarrollo de una respuesta de resistencia, aún cuando la mayor parte de las respuestas primarias comparten muchas de sus características (Walton, 1996; Huang, 2001; Wolpert et al., 2002).

Un ejemplo importante de hongos fitopatógenos que utilizan un conjunto de diferentes tipos de metabolitos en la interacción con sus hospederos, son los miembros del género *Botrytis* (van Kan, 2006). Se ha reportado que *B. cinerea*, produce diferentes metabolitos fitotóxicos de bajo peso molecular, de los cuales el botridial ha recibido la mayor atención y al cual se le relaciona con la virulencia del patógeno (van Kan, 2006). Sin embargo, además del botridial, *B. cinerea* produce otros metabolitos como los botcinólidos y el ácido oxálico, que puede utilizar como herramientas alternativas para establecerse e infectar a la planta hospedera (Tiedemann, 1997; Cessna et al., 2000; Colmenares et al., 2002; Reino et al., 2004; van Kan, 2006). El género *Alternaria* del cual forma parte el patógeno de este estudio, presenta al igual que *Botrytis* una producción de diferentes herramientas para lograr su establecimiento exitoso en sus hospederos, dependiendo de su especie o patotipo (Rotem, 1994; Otani et al., 1995; Panagrahi, 1997).

Es interesante comentar que el zinniol (**Fracción D**), descrito como el principal metabolito fitotóxico de *A. tagetica* y responsable de la actividad fitotóxica de la fracción lipofílica mediante el bioensayo de gota utilizando hojas de *T. erecta* (Gamboa-Angulo et al., 2000 & 2002; Cotty & Misaghi, 1984), en el modelo celular los resultados mostraron que este metabolito no posee una actividad fitotóxica marcada, tomando en cuenta que las concentraciones empleadas en este estudio para evaluar su efecto fitotóxico fueron significativamente mayores que las reportadas para otras no HSTs evaluadas en modelos celulares (Chen et al. 1992; Paciolla et al., 2005) y que sus efectos a nivel de daño al ADN y peroxidación de lípidos de membrana (Tabla 6.1, Fig. 6.6 y 6.7) fueron de menor intensidad a los inducidos por el conjunto de metabolitos lipofílicos (**Fracción C**) (Thuleau et al., 1988). Únicamente a nivel del daño a la membrana celular, señalada como el principal sitio de acción de zinniol, se detectó un efecto mayor con respecto a la **Fracción C** aunque nuevamente, la actividad presentada por zinniol fue menor a la esperada para un metabolito puro (Wang et al., 1996; Huang, 2001; Yao et al., 2001; Paciolla et al., 2004).

Cabe mencionar que los metabolitos considerados como fitotoxinas, HSTs o no-HSTs, al ser evaluados en modelos celulares, comúnmente presentan un efecto fitotóxico marcado y/o inducen una muerte celular en concentraciones en el rango μM , similar a la producida por el patógeno durante la interacción *in vivo* con su planta hospedera. La ausencia de una actividad fitotóxica significativa en las evaluaciones de zinniol a concentraciones relativamente altas ($0.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; ca $564 \mu\text{M}$), sugiere que este metabolito no es una fitotoxina, que no está necesariamente implicado en el proceso de patogénesis durante la interacción *A. tagetica*- *T. erecta* y que la aparición de lesiones necróticas en las hojas de *T. erecta* al ser tratadas con zinniol, ocurre como consecuencia de la inducción de una respuesta de defensa por parte de la planta (Wolpert et al. 2002). Este último punto, en muchas ocasiones, no es tomado en cuenta al momento de designar un metabolito como fitotoxina (Huang, 2001).

Finalmente, los resultados obtenidos en este trabajo permiten responder a las preguntas planteadas inicialmente y, sobretudo, presentan una nueva forma de evaluar los metabolitos vinculados con el proceso de patogénesis en las interacciones

planta-patógeno. Esta nueva perspectiva considera la importancia de evaluar no sólo al metabolito mayoritario, o el de mayor actividad fitotóxica contra la planta, identificándolo como el principal y único responsable de todo el proceso de patogénesis, sino al conjunto de los diferentes metabolitos producidos por el patógeno, como un grupo de componentes implicados en los procesos de patogénesis.

7.2 BIBLIOGRAFÍA

Able, A. (2003). *Role of reactive oxygen species in the response of barley to necrotrophic pathogens*. Protoplasma, 221, 137-143.

Arana-López, G., Gamboa-Angulo, M., García-Sosa, K., F. Escalante-Erosa and L.M. Peña-Rodríguez (2003). *A chemical study of the mycelium of A. tagetica*. Revista de la Sociedad de Química de México, 47, 303-306.

Asai, T., Stone, J., Heard, J.E., Kovtun, Y., Yorgey, P., J. Sheen and F. Ausubel (2000). *Fumonisin B1-induced cell death in Arabidopsis protoplasts requires jasmonate-, ethylene-, and salicylate-dependent signaling pathways*. The Plant Cell, 12, 1823–1835.

Ballio, A. (1991). *Non-host selective fungal phytotoxins: Biochemical aspect of their mode of action*. Experientia 47, 783-790.

Barash, I., Mor, H., D. Netzer and Y. Kashman (1981). *Production of zinniol by Alternaria dauci and its phytotoxic effect on carrot*. Physiological Plant Pathology, 19, 7-16.

Birch, P., Avrova, A., Dellagi, A., Lacomme, C. S. Santa Cruz and G. Lyon (2000). "Programmed cell death in plants in response to pathogen attack", in: *Molecular Plant Pathology: Annual Reviews*. Dickinson, M. and Beynon, J. (eds.). CRC Press LLC. Boca Ratón, pp 175-197.

Cessna, S., Sears V., M. Dickman and P. Low (2000). *Oxalic acid, a pathogenicity factor for Sclerotinia sclerotiorum, suppresses the oxidative burst of the host plant*. The Plant Cell, 12, 2191–2199.

Chen, H., Mirocha, C., Xie, W., L. Hogge and D. Olson (1992). *Production of the mycotoxin fumonisina B1 by Alternaria alternate f. sp. lycopersici*. Applied and Environmental Microbiology, 58, 3928-3931.

Collmer, A. (1998). *Determinants of pathogenicity and virulence in plant pathogenic bacteria*. Current Opinion in Plant Biology, 1, 329-335.

Colmenares, A., Aleu, J., Duran-Patron, R, I. Collado and R. Hernandez-Galán (2002). *The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of Botrytis cinerea*. Journal of Chemical Ecology, 28, 997-1005.

Cotty, P., J. Misaghi and R. Hine (1983). *Production of zinniol by Alternaria tagetica and its phytotoxic affect on Tagetes erecta*. Phytopathology, 73, 1326-1328.

Cotty, P. and J. Misaghi (1984). *Zinniol production by Alternaria species*. Phytopathology, 74, 785-788.

Dangl, J., R. Dietrich and M. Richberg (1996). *Death don't have no mercy: Cell death programs in plant-microbe interactions*. The Plant Cell, 8, 1793-1807.

Dangl, J. and J. Jones (2001). *Plant pathogens and integrated defense responses to infection*. Nature 411, 826-832.

Durbin, R. (1981). *Toxins in plant disease*. Academic Press, New York.

Freeman, G. (1966). *Isolation of alternariol and alternariol monomethyl ether from Alternaria dauci (Kuhn) Groves and Skolko*. Phytochemistry, 5, 719-725.

Galum, E. and A. Breiman (1992). "Quantitative assays of phytotoxins using plant protoplasts and isolated cells", in: *Plant Toxins Analysis*. Linskens, H.F. and Jackson, J.F. (Eds.) Springer-Verlag, New York, pp 33-50.

Gamboa-Angulo, M., Alejos-González, F., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2000). *Novel dimeric metabolites from Alternaria tagetica*. Journal of Natural Products, 63, 1117-1120.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2001). *Tagetolone and tagetenolone: two phytotoxic polyketides from Alternaria tagetica*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49, 1228-1232.

Gamboa-Angulo, M., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Alejos-González, F., G. Delgado-Lamas and L. Peña-Rodríguez (2002). *Natural zinniol derivatives from Alternaria tagetica. Isolation, synthesis, and structure-activity correlation*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 1053-1058.

Gavrieli, Y., Y. Sherman and S. Ben-Sasson (1992). *Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation*. Journal of Cell Biology, 11, 493-501.

Govrin, E. and A. Levine (2000). *The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen Botrytis cinerea*. Current Biology, 10, 751-757.

Hotchkiss, E. and L. Baxter Jr. (1983). *Pathogenicity of Alternaria tagetica on Tagetes*. Plant Disease, 67, 1288-1290.

Huang, J-S (2001). *Plant pathogenesis and resistance*. Kluwer academic publishers, Boston.

Kiba, A., Takata, O., K. Ohnishi and Y. Hikichi (2006). *Comparative analysis of*

induction pattern of programmed cell death and defense-related responses during hypersensitive cell death and development of bacterial necrotic leaf spots in eggplant. Planta, 224, 981-994.

Oliver R. and P. Solomon (2004). *Does the oxidative stress used by plants for defense provide a source of nutrients for pathogenic fungi?* Trends in Plant Science, 9, 472-473.

Otani, H., M. Kodama and K. Kohomoto (1995). *Alternaria toxins and their effects on host plants.* Canadian Journal of Botany, 73 (suppl. 1), S453-S458.

Paciolla, C., Dipierro, N., Mule, G., A. Logrieco and S. Dipierro (2004). *The mycotoxins beauvericin and T-2 induce cell death and alteration to the ascorbate metabolism in tomato protoplasts.* Physiological and Molecular Plant Pathology, 65, 49-56.

Panigrahi, S. 1997. "Alternaria toxins", in: *Handbook of Plant and Fungal Toxicants.* Felix, J.P. (ed.). CRS Press, Boca Ratón, pp 319-336.

Reino, J., Hernandez-Galan, R., R. Duran-Patron and I. Collado (2004). *Virulence-toxin production relationship in isolates of the plant pathogenic fungus Botrytis cinerea.* Journal of Phytopathology, 152, 563-566.

Rotem, J. (1994). *The Genus Alternaria: Biology, epidemiology, and pathogenicity.* APS Press, Minnesota.

Rudolph, K. (1976). "Non-specific toxins", in: *Encyclopedia of Plant Physiology., New Series 4: Physiological Plant Pathology.* Heitefuss, R. and Williams, P. (ed.). Springer-Verlag, Berlin, pp 270-315.

Ryerson, D. and M. Heath (1996). *Cleavage of nuclear DNA into oligonucleosomal fragments during cell death induced by fungal infection or abiotic treatments.* The Plant Cell, 8, 393-404.

Scheffer, R. (1991). *Role of toxins in evolution and ecology of plant pathogenic fungi.* Experientia, 47, 804-811.

Starratt, N. (1968). *Zinniol: a major metabolite of Alternaria zinniae.* Canadian Journal of Chemistry, 46, 767- 770.

Sterlie, A., Upadhyay, J., Hershenhorn, G., G. Strobel and G. Molina (1991). *The phytotoxins of Mycosphaerella fijiensis, the causative agent of Black Sigatoka disease of bananas and plantains.* Experientia, 47, 853-859.

Tada, Y., Hata, S., Takata, Y., Nakayashiki, H., Y. Tosa and S. Mayama (2001). *Induction and signaling of an apoptotic response typified by DNA laddering in the*

defense response of oats to infection and elicitors. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14, 477-486.

Thuleau, P., Graziana, A., Rossignol, M., Kausst, H., P. Auriol and R. Ranjeva (1988). *Binding of the phytotoxin zinniol stimulates the entry of calcium into plant protoplasts. Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85, 5932-5935.

Tiedemann, A. (1997). *Evidence for a primary role of active oxygen species in induction of host cell death during infection of bean leaves with Botrytis cinerea. Physiological and Molecular Plant Pathology*, 50, 151-166.

Van Baarlen, P. M. Staats. and J. van Kan (2004). *Induction of programmed cell death in lily by the fungal pathogen Botrytis elliptica. Molecular Plant Pathology*, 5, 559-574.

Van Kan, J. (2006). *Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. Trends in Plant Science*, 11, 247-253.

Walton, J. (1996). *Host-selective toxins: agents of compatibility. The Plant Cell*, 8, 1723-1733.

Wang, H., Li, J., R. Bostock and D. Gilchrist (1996). *Apoptosis: A functional paradigm for programmed plant cell death induced by a host-selective phytotoxin and invoked during development. The Plant Cell*, 8, 375-391.

Wolpert, T., Dunkle, L. and L. Ciuffetti (2002). *Host-selective toxins and avirulence determinants: what's in a name? Annual Review of Phytopathology*, 40, 251-285.

Wood, R., A. Ballio and A. Graniti (1992). *Phytotoxins in Plant Diseases. Academic Press, London*.

Yao, N., Tada, Y., Park, P., Nakayashiki, H., Y. Tosa and S. Mayama (2001). *Novel evidence for apoptotic cell response and differential signals in chromatin condensation and DNA cleavage in victorin-treated oats. The Plant Journal*, 28, 13-26.

Zhang, H., Zhang, X., Mao, B., Q. Li and Z. He (2004). *Alpha-picolinic acid, a fungal toxin and mammal apoptosis-inducing agent, elicits hypersensitive-like response and enhances disease resistance in rice. Cell Research*, 14, 27-33.

Capítulo 8

Perspectivas

Los resultados obtenidos de este trabajo plantean una nueva perspectiva al momento de establecer el verdadero papel de los metabolitos considerados como fitotoxinas en la interacción planta-patógeno. La presencia de una PCD en cultivos tratados con la fracción conteniendo los metabolitos totales (**Fracción A**), que no se reproduce al evaluar los metabolitos presentes en las fracciones separadas de acuerdo a su naturaleza química, podría constituir una nueva forma de evaluar la función de los metabolitos fitotóxicos en la interacción planta-patógeno.

Sería de particular interés el llevar a cabo evaluaciones similares en modelos para los cuales se conoce la identidad de sus HSTs y no-HSTs, e.g. el modelo *Lycopersicon esculentum*-*A. alternata* f.sp. *lycopersici*.

Para el caso de la interacción *T. erecta*-*A. tagetica*, investigada en este trabajo, sería interesante determinar los efectos causados al evaluar los metabolitos hidrofílicos en forma pura, así como las respuestas que a nivel celular pudieran provocar otros metabolitos estructuralmente relacionados con el zinniol presentes en la fracción lipofílica. Los resultados obtenidos podrían contribuir en la búsqueda del o de los metabolitos considerados como factores de virulencia en esta interacción planta-patógeno.

Por otra parte, será conveniente purificar las diferentes fitotoxinas contenidas en cada fracción y evaluarlas de manera individual o por grupos, con el fin de evaluar sus efectos a nivel celular y compararlos con los observados al evaluar la fracción original.

Para comparar los efectos del zinniol y también los de las fracciones o grupos de fitotoxinas posteriormente aislados, deberá adicionarse otra fitotoxina purificada a homogeneidad o producida químicamente.

El entendimiento del papel que juegan los metabolitos fitotóxicos en la interacción planta-patógeno aún es limitado; sin embargo, el empleo de nuevas estrategias resulta de suma importancia para elucidar, el complejo esquema que se presenta durante la interacción entre un patógeno y una planta hospedera.

Anexos

9.1 *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee

A. tagetica es un hongo que presenta hifas septadas, profusamente ramificadas, de color marrón claro a oscuro y de 3.7 a 5.5 μm de diámetro. Sus conidióforos son erectos en grupos, sin ramificaciones, septados que llevan conidios solitarios o en cadenas. Los conidios son muriformes y los jóvenes típicamente poseen entre 3 a 9 septos transversos y de 1 a 4 longitudinales, mientras que los conidios viejos presentan de 8 a 14 septos transversales y de 3 a 6 longitudinales (Fig. 9.1). El color de los conidios es marrón oscuro, con una longitud total de 43.4-384.4 μm de ancho (Cotty & Mishagi, 1984, Tomiaka et al., 2000).

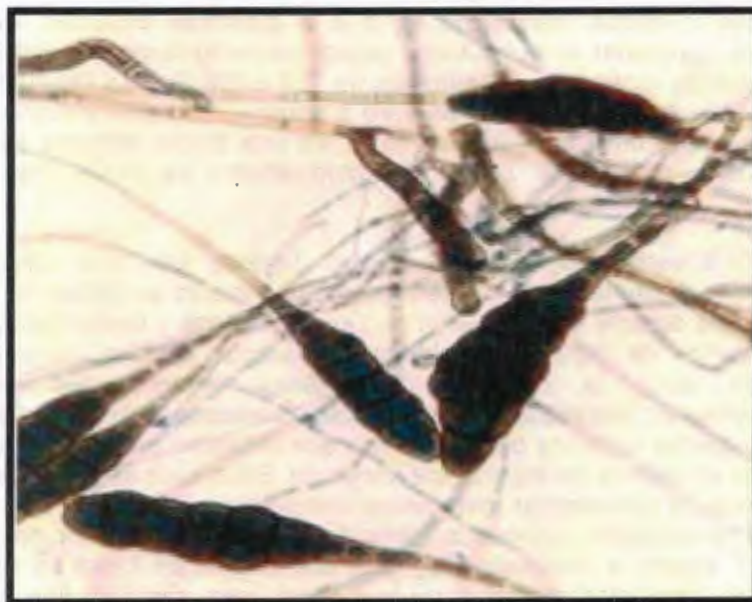


Figura 9.1. *Alternaria tagetica* Shome & Mustafee.

Los primeros síntomas de enfermedad en plantas de *Tagetes erecta* infectadas con *A. tagetica* aparecen de 6 a 7 semanas después de la infección, y visualmente se observan como lesiones necróticas en hojas, tallos, flores y frutos. Las lesiones aparecen primero como pequeñas manchas circulares de color marrón oscuro con un halo amarillento alrededor del área de necrosis, que puede coalescer y matar al foliolo. Las especies *T. erecta* y *T. patula* han sido identificadas como los principales hospederos de *A. tagetica* (Cotty et al., 1983).

9.2 *Tagetes erecta* L.

El cempasúchil (*Tagetes erecta*) es una planta que pertenece a la familia de las *Asteraceas* (*Compositae*) y al género *Tagetes*, del cual existen 50 especies en el mundo. En México se encuentran 32 especies, por lo que se le considera a nuestro país como el centro de origen de esta planta. El nombre indígena en náhuatl, *cempoalxóchitl*, significa "flor de 20 hojas". Actualmente *T. erecta* se conoce con el nombre común de cempasúchil, aunque también se le denomina como anisillo, periquillo, flor de tierra adentro, hierba de Santa María, curcumin, hierba de anís, pericón, falso pericón, flor de muerto y xpuhuk (García et al., 1992).

T. erecta es una planta anual, erecta, robusta y aromática. El tallo es ramificado, de 40 a 180 cm de alto. Estructuralmente presenta hojas superiores alternadas e inferiores opuestas con un raquis de 3 a 5 cm de largo, hueco y considerablemente alargado hacia la base. Estos pedúnculos sostienen al involucre, cuya forma es acampanulada, de 17 a 22 mm de longitud y de 8 a 10 mm de ancho, conteniendo 2 hileras marginales de 5 a 7 glándulas ovaladas. Las flores son numerosas, agrupadas en el involucre, generalmente liguladas, tubulares o bilabiadas. Las cabezuelas contienen generalmente de 150 a 250 flores y las corolas presentan una pigmentación de color amarillo claro a naranja. *T. erecta* presenta aquenios de color negro-café, de 8 a 10 mm de largo. Es una planta alógama que se propaga principalmente por semilla. Su número cromosómico es $2n=24$ (Fig. 9.2) (Trostle, 1968).

Las diversas especies del género *Tagetes* han sido utilizadas en ritos ceremoniales desde la época de los mayas. Actualmente se utilizan en la decoración de los altares durante la celebración de Día de Muertos y como planta de ornato en algunas partes de México y Guatemala. Diversos pueblos indígenas la siguen empleando para la curación de algunas enfermedades parasitarias y gastrointestinales, basándose en tradiciones ancestrales. En algunas regiones de California, ciertas especies de este género son utilizadas para el control biológico de nemátodos en cultivos de importancia comercial. Estos usos señalan la importancia de esta especie al biosintetizar metabolitos secundarios de utilidad potencial para las industrias farmacéutica, cosmética, alimenticia y agroquímica. Uno de los principales usos de *T. erecta*, a nivel industrial, es la producción, en forma de harina molida o extracto de pigmentos extraídos de sus flores para su utilización en la industria avícola, con el fin de darle una buena coloración a la carne y a la yema del huevo de las aves de granja (García et al., 1992).



Figura 9.2. *Tagetes erecta* L.

9.3 BIBLIOGRAFÍA

Cotty, P., J. Misaghi and R. Hine (1983). *Production of zinnias by Alternaria tagetica and its phytotoxic effect on Tagetes erecta*. Phytopathology, 73, 1326-1328.

Cotty, P. and J. Misaghi (1984). *Zinnia production by Alternaria species*. Phytopathology, 74, 785-788.

Dimock, A. and J. Osborn (1943). *An Alternaria disease of Zinnia*. Phytopathology, 33, 372-381.

García, A. Oviedo, A. R. Ramírez and A. Vázquez (1992). *Cultivo de la flor de cempazúchitl*. Laboratorios Bioquímex S.A de C.V., Oaxaca, 7 pp.

Hotchkiss, E. and L. Baxter Jr. (1983). *Pathogenicity of Alternaria tagetica on Tagetes*. Plant Disease, 67, 1288-1290.

Tomioka, K., T. Sato and H. Koganezama (2000). *Marigold leaf spot caused by Alternaria tagetica new to Japan*. Journal of General Plant Pathology, 66, 294-298.

Trostle, N. (1968). *The ethnobotany of Tagetes*. Economic Botany, 45, 317-325.